

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-199588

(43)Date of publication of application : 15.07.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A61K 38/00
A61K 39/395
A61K 45/00
A61K 48/00
A61P 25/00
A61P 25/16
A61P 25/28
C07K 14/81
C07K 16/40
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12N 9/50
C12P 21/02
C12Q 1/37
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50

(21)Application number : 2002-283631

(71)Applicant : DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
KAZUSA DNA KENKYUSHO

(22)Date of filing : 27.09.2002

(72)Inventor : OBARA OSAMU
NAGASE TAKAHIRO
OISHI MICHIO
YOKOTA HIROSHI
SHIMOMURA CHIEKO

(30)Priority

Priority number : 2001301800 Priority date : 28.09.2001 Priority country : JP

(54) NEW UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To find out a new ubiquitin specific protease (USP), and provide an useful or new USP and a polypeptide or peptide derived from it, a polynucleotide encoding the same, an antibody against the polypeptide or peptide, an inhibitor, antagonist and

activating agent of the physiological activity of the new USP, a medicinal composition by using them, a method for producing the polypeptide or peptide by a gene engineering method, a method for identifying the inhibitor, antagonist, and activator, and a method for diagnosing diseases associated with the new USP and a kit.

SOLUTION: This polypeptide consisting of a specific amino acid sequence, the polypeptide and peptide derived from the polypeptide and the polynucleotide encoding these polypeptide and peptide or its complementing chain.

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application]This invention relates to the gene which encodes new protease (it may be hereafter called USP for short) and it which have deubiquitin-ized activity. Polypeptide or peptide which has all or a part of amino acid sequences of new USP in more detail, The polynucleotide which is the polynucleotide which encodes this polypeptide or this peptide, or its complementary strand, The transformant containing the recombinant vector containing this polynucleotide, and this recombinant vector, The compound which has the antibody, this polypeptide or this polynucleotide to this polypeptide or this peptide, and an interaction, A manufacturing method of the antagonist of this polypeptide, the medicinal composition containing these one or more sorts, this polypeptide, or this peptide, It is related with the reagent kit used for the measuring method of this polypeptide, this peptide or this polynucleotide, the identification method of the compound which has an interaction and this polypeptide, this peptide, or this polynucleotide and this identification method, or this measuring method.

[0002]

[Description of the Prior Art]Ubiquitin (it may call for short the following Ub) is a peptide chain which consists of 76 amino acid residue, and the amino acid sequence is saved from yeast even to Homo sapiens at the altitude. The role of Ub in the living body is various, and is participating in many vital reactions, such as oncogenesis (nonpatent literatures 1-4), a cell cycle (nonpatent literatures 5-7), virus infection (nonpatent literature 8), and a neurodegenerative disease (nonpatent literatures 9-11).

[0003]The most important function of Ub is the work as a signal in the proteolysis in 26S proteasome. With a ubiquitin activation enzyme (E1), a ubiquitin binding enzyme (E2), and a series of ubiquitin-ized enzymes called ubiquitin ligase (E3), the isopeptide bond of the Ub is

carried out to target protein, and it forms a poly ubiquitin chain. When the poly ubiquitin chain is recognized by proteasome as a decomposition signal, the ubiquitin-ized protein is disassembled.

[0004]Existence of the deubiquitin-ized enzyme (DUB) which carries out the catalyst of the deubiquitin-ized reaction for which Ub dissociates from the ubiquitin-ized protein on the other hand is reported. DUB is roughly classified into two families from the structure (nonpatent literatures 12-14). One is called ubiquitin C terminal hydrolase (Ubiquitin C-terminal hydrolase) (UCH), there are many things of molecular weight 20kDa to 30kDa, and the primary structure is saved between different species. UCH dissociates Ub, when the low molecule has mainly combined with the C terminal of Ub. Another is what is called ubiquitin unique protease (Ubiquitin specific protease) (USP, UBP, or UCH_type II), The molecular weight is as various as 40kDa to 150kDa, and there is little similarity of the amino acid sequence between different species. USP as the active domain A cystein (Cys) domain (Cys box), It is a cysteine protease which makes an active site t

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]Polypeptide chosen from the following group;

** Polypeptide which becomes the array number 1 of a Sequence listing from an amino acid sequence of a description, ** Polypeptide containing polypeptide which becomes the array number 1 of a Sequence listing from an amino acid sequence of a description, ** It has the homology on polypeptide which becomes the array number 1 of a Sequence listing from an amino acid sequence of a description, and at least about 70% of amino acid sequence, And polypeptide which has deubiquitin-ized activity and polypeptide which has variation, such as deletion of amino acid of one piece thru/or some, substitution, addition, or insertion, among an amino acid sequence in any 1 polypeptide of the ** aforementioned ** to **, and has deubiquitin-ized activity.

[Claim 2]Polypeptide which is the polypeptide chosen from the following group and has deubiquitin-ized activity;

** Polypeptide which becomes the array number 1 of a Sequence listing from an amino acid sequence of a description, ** Polypeptide containing polypeptide which becomes the array number 1 of a Sequence listing from an amino acid sequence of a description, ** Polypeptide which becomes the array number 1 of a Sequence listing from an amino acid sequence of a description, and polypeptide which has the homology on at least about 70% of amino acid sequence, And polypeptide which has variation, such as deletion of amino acid of one piece thru/or some, substitution, addition, or insertion, among an amino acid sequence in any 1 polypeptide of the ** aforementioned ** to **.

[Claim 3]Peptide which has at least about five continuous amino acid sequences of an amino acid sequence of a description in the array number 1 of a Sequence listing.

[Claim 4]Polypeptide chosen from the following group;

(a) Polypeptide which consists of 521 continuous amino acid residue from amino acid residue

of the 1st amino terminal of polypeptide which becomes the array number 1 of a Sequence listing from an amino acid sequence of a description to the 521st amino acid residue, (b) It has the homology on polypeptide which consists of 521 continuous amino acid residue from amino acid residue of the 1st amino terminal of polypeptide which becomes the array number 1 of a Sequence listing from an amino acid sequence of a description to the 521st amino acid residue, and at least about 70% of amino acid sequence, And in polypeptide of polypeptide which checks the deubiquitin-ized activity of the polypeptide according to claim 1 or 2 and (c) above (a), or the above (b), Polypeptide which has variation, such as deletion of amino acid of one piece thru/or some, substitution, addition, or insertion, among an amino acid sequence, and checks the deubiquitin-ized activity of the polypeptide according to claim 1 or 2.

[Claim 5] Polypeptide which is the polypeptide chosen from the following group and checks the deubiquitin-ized activity of the polypeptide according to claim 1 or 2;

(a) Polypeptide which consists of 521 continuous amino acid residue from amino acid residue of the 1st amino terminal of polypeptide which becomes the array number 1 of a Sequence listing from an amin

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-199588
(P2003-199588A)

(43) 公開日 平成15年7月15日 (2003.7.15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 39/395	D 2 G 0 4 i
A 6 1 K 38/00		45/00	4 B 0 2 4
39/395		48/00	4 B 0 5 0
45/00		A 6 1 P 25/00	4 B 0 6 3
48/00		25/16	4 B 0 6 4
審査請求 未請求 請求項の数29 O L (全 40 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-283631 (P2002-283631)
(22) 出願日 平成14年9月27日 (2002.9.27)
(31) 優先権主張番号 特願2001-301800 (P2001-301800)
(32) 優先日 平成13年9月28日 (2001.9.28)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002831
第一製薬株式会社
東京都中央区日本橋3丁目14番10号
(71) 出願人 596175810
財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所
千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7
(72) 発明者 小原 収
千葉県木更津市矢那1532番3号 財団法人
かずさディー・エヌ・エー研究所内
(74) 代理人 100088904
弁理士 庄司 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ユビキチン特異プロテアーゼ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 新規U S Pを見出し、有用性ある新規U S Pおよびこれに由来するポリペプチドまたはペプチド、これらをコードするポリヌクレオチド、該ポリペプチドまたはペプチドに対する抗体、新規U S Pの生理活性の阻害剤、拮抗剤、賦活剤、これらを利用した医薬組成物、並びに遺伝子工学手法による該ポリペプチドまたはペプチドの製造法、上記阻害剤、拮抗剤、賦活剤の同定方法、新規U S Pに関連する疾病の診断のための方法およびキットを提供する。

【解決手段】 特定ののアミノ酸配列からなるポリペプチド、当該ポリペプチドに由来するポリペプチドおよびペプチド、これらポリペプチドおよびペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の群より選ばれるポリペプチド；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ②配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチド、
- ③配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、および
- ④前記①から③のいずれか1のポリペプチドにおいてアミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド。

【請求項2】 下記の群より選ばれるポリペプチドであって、脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- ②配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチド、
- ③配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、および
- ④前記①から③のいずれか1のポリペプチドにおいてアミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有するポリペプチド。

【請求項3】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも約5個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項4】 下記の群より選ばれるポリペプチド；

- (a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチド、
- (b) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつ請求項1または請求項2に記載のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチド、および
- (c) 前記(a)または前記(b)のポリペプチドにおいて、アミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有し、かつ請求項1または請求項2に記載のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチド。

【請求項5】 下記の群より選ばれるポリペプチドであって、請求項1または請求項2に記載のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチド；

- (a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からな

るポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチド、

(b) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、および

(c) 前記(a)または前記(b)のポリペプチドにおいて、アミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有するポリペプチド。

【請求項6】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも約5個の連続するアミノ酸配列を有し、かつ請求項1または請求項2に記載のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するペプチド。

【請求項7】 請求項1若しくは請求項2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項8】 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項9】 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の少なくとも約15個の連続する塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項10】 請求項7から請求項9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項11】 請求項4若しくは請求項5に記載のポリペプチド、または請求項6に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項12】 配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項13】 請求項7から請求項12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項14】 組換えベクターが発現組換えベクターである請求項13に記載の組換えベクター。

【請求項15】 請求項13または請求項14に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

【請求項16】 請求項1、請求項2、請求項4若しくは請求項5に記載のポリペプチド、または請求項3若しくは請求項6に記載のペプチドの製造方法であって、請求項14に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程、または請求項13若しくは請求

項14に記載の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む方法。

【請求項17】 請求項1、請求項2、請求項4若しくは請求項5に記載のポリペプチド、または請求項3若しくは請求項6に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項18】 脱ユビキチン化活性を阻害する請求項17に記載の抗体。

【請求項19】 請求項1若しくは請求項2に記載のポリペプチドと相互作用してその生理活性を阻害する若しくは増強する化合物、および／または請求項7若しくは請求項8に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する若しくは促進する化合物の同定方法であって、請求項1、請求項2、請求項4若しくは請求項5に記載のポリペプチド、請求項3若しくは請求項6に記載のペプチド、請求項7から請求項12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項13若しくは請求項14に記載の組換えベクター、請求項15に記載の形質転換体、および請求項17若しくは請求項18に記載の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする方法。

【請求項20】 請求項1若しくは請求項2に記載のポリペプチドと相互作用してその生理活性を阻害する若しくは増強する化合物、および／または請求項7若しくは請求項8に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する若しくは促進する化合物の同定方法であって、化合物と該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと化合物とを接触させ、次いで、化合物と該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、化合物が該ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、該ポリペプチドの生理活性または該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するかどうかを決定する方法。

【請求項21】 請求項19または請求項20に記載の方法で同定された化合物。

【請求項22】 請求項1若しくは請求項2に記載のポリペプチドと相互作用して脱ユビキチン化活性を阻害する若しくは増強する化合物、または請求項7若しくは請求項8に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する若しくは促進する化合物。

【請求項23】 請求項4若しくは請求項5に記載のポリペプチドおよび／または請求項6に記載のペプチドからなる、請求項1若しくは請求項2に記載のポリペプチドの拮抗剤。

【請求項24】 請求項1、請求項2、請求項4または請求項5に記載のポリペプチド、請求項3または請求項6に記載のペプチド、請求項7から請求項12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項13または請

求項14に記載の組換えベクター、請求項15に記載の形質転換体、請求項17または請求項18に記載の抗体、請求項21または請求項22に記載の化合物、および請求項23に記載の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項25】 請求項1、請求項2、請求項4または請求項5に記載のポリペプチド、請求項3または請求項6に記載のペプチド、請求項7から請求項12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項13または請求項14に記載の組換えベクター、請求項15に記載の形質転換体、請求項17または請求項18に記載の抗体、請求項21または請求項22に記載の化合物、および請求項23に記載の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする神経変性疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項26】 前記神経変性疾患がアルツハイマー病および／またはパーキンソン病である請求項25に記載の神経変性疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項27】 請求項1、請求項2、請求項4または請求項5に記載のポリペプチド、請求項3または請求項6に記載のペプチド、請求項7から請求項12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項13または請求項14に記載の組換えベクター、請求項15に記載の形質転換体、請求項17または請求項18に記載の抗体、請求項21または請求項22に記載の化合物、および請求項23に記載の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする筋萎縮症の防止剤および／または治療剤。

【請求項28】 請求項1、請求項2、請求項4若しくは請求項5に記載のポリペプチド、または請求項7、請求項8、請求項11若しくは請求項12に記載のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法。

【請求項29】 請求項1、請求項2、請求項4または請求項5に記載のポリペプチド、請求項3または請求項6に記載のペプチド、請求項7から請求項12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項13または請求項14に記載の組換えベクター、請求項15に記載の形質転換体、請求項17または請求項18に記載の抗体、および請求項23に記載の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、脱ユビキチン化活性を有する新規なプロテアーゼ（以下、USPと略称することもある）およびそれをコードする遺伝子に関するものである。さらに詳しくは、新規USPのアミノ酸配列の全部または一部を有するポリペプチドまたはペプチド、該ポリペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換え

ベクターを含む形質転換体、該ポリペプチドまたは該ペプチドに対する抗体、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物、該ポリペプチドの拮抗剤、これらの1種以上を含む医薬組成物、該ポリペプチドまたは該ペプチドの製造方法、該ポリペプチドまたは該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物の同定方法、該ポリペプチドまたは該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドの測定方法、並びに該同定方法または該測定方法に使用する試薬キットに関する。

【0002】

【従来の技術】ユビキチン（以下Ubと略称することもある）は76個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖であり、そのアミノ酸配列は酵母からヒトまで高度に保存されている。Ubの生体内での役割は様々であり、発癌（非特許文献1～4）、細胞周期（非特許文献5～7）、ウイルス感染（非特許文献8）、および神経変性疾患（非特許文献9～11）等の多くの生体反応に関与している。

【0003】Ubの最も重要な機能は、26Sプロテアソームでの蛋白分解におけるシグナルとしての働きである。ユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）およびユビキチンリガーゼ（E3）といった一連のユビキチン化酵素によって、Ubは標的蛋白質にイソペプチド結合し、ポリユビキチン鎖を形成する。そのポリユビキチン鎖が分解シグナルとしてプロテアソームに認識されることにより、ユビキチン化された蛋白質は分解される。

【0004】一方、ユビキチン化された蛋白質からUbが解離する脱ユビキチン化反応を触媒する脱ユビキチン化酵素（DUB）の存在が報告されている。DUBは、その構造から大きく2つのファミリーに分類されている（非特許文献12～14）。1つはユビキチンC末端ヒドロラーゼ（Ubiquitin C-terminal hydrolase）（UCH）と呼ばれるもので、分子量20kDaから30kDaのものが多く、異種間で一次構造が保存されている。UCHは主にUbのC末端に低分子が結合している場合にUbを解離する。もう一つはユビキチン特異プロテアーゼ（Ubiquitin specific protease）（USP、UBP、あるいはUCH__タイプII）と呼ばれるもので、その分子量は40kDaから150kDaと様々であり、異種間でのアミノ酸配列の共通性が少ない。USPはその活性ドメインとしてシステイン（Cys）ドメイン（Cys box）、ヒスチジン（His）ドメイン（His box）およびアスパラギン酸（Asp）ドメインを持ち、Cysドメイン内に存在するシステイン残基を活性部位とするシステインプロテアーゼである。また、USPのN末端側配列が基質認識に関与するという報告（非特許文献15）がある。USPはUb

のC末端に高分子が結合している場合にUbを解離する。

【0005】USPの生体内での機能は大きく3つに分けることができる。その1は、リボソーム蛋白融合ユビキチンやペプチド結合型ポリユビキチン鎖といった前駆体UbからUbを生成する機能である。これにはUSPの1つであるUb-CEP52等が関与している。その2は、イソペプチド結合をしたユビキチン化蛋白質からUbを解離する機能であり、蛋白質のユビキチン化を抑制することにより蛋白質の分解を抑制する。その3は、プロテアソームにより分解された後のイソペプチド結合型ポリユビキチン鎖を解体する機能であり、例えば、USP5として知られているイソペプチダーゼTがこの機能を有している（非特許文献16）。

【0006】UbおよびUSP等から構成されるユビキチンシステムの機能の1つは、生体内で生じた異常蛋白質の除去、および転写因子やシグナル伝達因子等の分解による量的調節等であり（非特許文献17）、USPの機能障害はこのシステムの異常をきたす。USPの異常と発癌や神経変性疾患との関連が示唆されている（非特許文献17～19）。例えば、アルツハイマー病やパーキンソン病で観察される蛋白質凝集体の多くが抗ユビキチン抗体に反応することが報告されている（非特許文献17）。また、USPは染色体構造の維持にも関与しており、ユビキチン化されたヒストンの脱ユビキチン化が染色体凝集に重要であることが知られている（非特許文献20）、USPファミリーの1つであるUSP16がH2Aを脱ユビキチン化することが報告されている

（非特許文献21）。さらに、ユビキチン経路が筋萎縮症と関連していることについても報告されている（非特許文献22）。

【0007】

【非特許文献1】「フェブス レターズ（FEBS Letters）」、1997年、第420巻、p. 25-

【非特許文献2】「オンコジーン（Oncogene）」、1993年、第8巻、p. 2307-

【非特許文献3】「オンコジーン（Oncogene）」、1995年、第10巻、p. 2179-

【非特許文献4】「ネイチャー（Nature）」、1993年、第366巻、p. 313-

【非特許文献5】「アニュアル レビュー オブ バイオケミストリー（Annual Review of Biochemistry）」、1998年、第67巻、p. 425-

【非特許文献6】「プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミーオブ サイエンス オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ（Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The

United States of America)」、1996年、第93巻、p. 3275-

【非特許文献7】「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1997年、第272巻、p. 51-

【非特許文献8】「エンボ ジャーナル (EMBO Journal)」、1997年、第16巻、p. 1519-

【非特許文献9】「トレンズ イン ニューロサイエンス (Trends In Neuroscience)」、1998年、第21巻、p. 516-

【非特許文献10】「ネイチャー (Nature)」、1998年、第395巻、p. 451-452

【非特許文献11】「ネイチャー ジェネティクス (Nature Genetics)」、1998年、第23巻、p. 47-

【非特許文献12】「バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチコミュニケーションズ (Biochemical And Biophysical Research Communications)」、1999年、第266巻、p. 633-

【非特許文献13】「ファセブ ジャーナル (FASEB Journal)」、1997年、第11巻、p. 1245-

【非特許文献14】「クリティカル レビューズ イン バイオケミストリー アンド モレキュラー バイオロジー (Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology)」、1998年、第33巻、p. 337-

【非特許文献15】「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal Of Biological Chemistry)」、2001年、第276巻、p. 20357-20363

【非特許文献16】「バイオケミストリー (Biochemistry)」、1995年、第34巻、p. 14535-

【非特許文献17】鈴木俊顕、志村秀樹、服部信孝、「ユビキチンと神経変性疾患」、「実験医学」、2000年、第18巻、p. 1478-1482

【非特許文献18】鈴木俊顕、「脱ユビキチン化酵素の多彩な作用」、「実験医学」、2001年、第19巻、p. 193-

【非特許文献19】阿南正、中尾光善、「ユビキチン病の分子機構」、「蛋白質・核酸・酵素」、1999年、第44巻、p. 776-

【非特許文献20】「バイオエッセイズ (BioEssays)」、1992年、第14巻、p. 9-

【非特許文献21】「プロシーディング オブ ザ

ナショナル アカデミーオブ サイエンス オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ (Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States of America)」、1999年、第96巻、p. 2828-

【非特許文献22】「カレント オピニオン イン クリニカル ニュートリション アンド メタボリック ケア (Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic care)」、2001年、第4巻、p. 183-190

【非特許文献23】「かずさDNA研究所DNA配列解析分析情報データベース、ヒュージ (HUGE)」, インターネット<<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage>>

【0008】

【発明が解決しようとする課題】生体内には多くのUSPが存在しており、それぞれ異なる基質特異性や生理機能を有していると考えられる。従って、USPの異常に起因する疾患、例えば発癌や神経変性疾患等の解明、並びにそれらの防止、治療および診断を可能とする上では、数多くの新たなUSPを発見し利用することが必要である。

【0009】本発明が解決しようとする課題の一つは、新規なUSPを見だし、生体内における該USPの制御を可能にすることである。より具体的には、新規な特性をもつUSPを提供することであり、それに伴い有用性がある新規USP由来のポリペプチドまたはペプチド、これらをコードするポリヌクレオチド、および該ポリペプチドまたは該ペプチドに対する抗体を提供することである。さらに、新規USPの発現および/またはその生理活性の阻害剤、拮抗剤または促進剤等の同定を行うことであり、同定された化合物を提供することである。また、上記ポリペプチドまたは上記ペプチド、上記ポリヌクレオチド、上記抗体、および上記化合物を利用した医薬組成物、並びに上記ポリペプチドまたは上記ペプチドまたは上記ポリヌクレオチドの測定方法を提供することである。さらにまた、上記ポリヌクレオチドを用いた遺伝子工学手法による新規USP由来のポリペプチドまたはペプチドの製造法を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、新規特性を有するUSP遺伝子およびその蛋白質を得ることに成功した。より具体的には、かずさDNA研究所ヒト長鎖cDNA解析情報データベースから、新規プロテアーゼ候補遺伝子としてcDNAクローンを抽出し、大腸菌を用いた遺伝子発現系で発現させて該遺伝子がコードする蛋白質を得た。さらに、得られた蛋白質が脱ユビキチン化活性を示すこと、

またN末端側第1番目から第521番目の連続する521個のアミノ酸残基を欠失した当該蛋白質は脱ユビキチン化活性を示さないことを確認し、本発明を完成した。

【0011】すなわち、本発明は、(1)下記の群より選ばれるポリペプチド；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

②配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチド、

③配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、

および

④前記①から③のいずれか1のポリペプチドにおいてアミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有し、かつ脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド、(2)下記の群より選ばれるポリペプチドであって、脱ユビキチン化活性を有するポリペプチド；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

②配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチド、

③配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、および

④前記①から③のいずれか1のポリペプチドにおいてアミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有するポリペプチド、

(3)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも約5個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド、(4)下記の群より選ばれるポリペプチド；

(a)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチド、

(b)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつ前記(1)または前記(2)のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチド、および

(c)前記(a)または前記(b)のポリペプチドにおいて、アミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有し、かつ前記(1)または前記(2)のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチド、(5)下記の群より選ばれるポリペプチドであって、前記(1)または前記

(2)のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチド；

(a)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチド、

(b)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、および

(c)前記(a)または前記(b)のポリペプチドにおいて、アミノ酸配列中1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、または挿入といった変異を有するポリペプチド、(6)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個の連続するアミノ酸残基からなるポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも約5個の連続するアミノ酸配列を有し、かつ前記(1)または前記(2)のポリペプチドの脱ユビキチン化活性を阻害するペプチド、(7)前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチド、または前記(3)のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(8)配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(9)配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の少なくとも約15個の連続する塩基配列からなるポリヌクレオチド、(10)前記(7)から前記(9)のいずれかのポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、(11)前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチド、または前記(6)のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(12)配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(13)前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、(14)組換えベクターが発現組換えベクターである前記(13)の組換えベクター、(15)前記(13)または前記(14)の組換えベクターを導入されてなる形質転換体、(16)前記(1)、前記(2)、前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチド、または前記(3)若しくは前記(6)のペプチドの製造方法であって、前記(14)の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程、または前記(13)若しくは前記(14)の組換えベクターを利用した無細胞蛋白質合成手段を含む方法、(17)前記(1)、前記(2)、前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチド、または前記(3)若しくは前記(6)のペプチドを免疫学的に認識する抗体、(18)

脱ユビキチン化活性を阻害する前記(17)の抗体、
 (19)前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチドと相互作用してその生理活性を阻害する若しくは増強する化合物、および/または前記(7)若しくは前記(8)のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する若しくは促進する化合物の同定方法であって、前記(1)、前記(2)、前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチド、前記(3)若しくは前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)若しくは前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、および前記(17)若しくは前記(18)の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする方法、(20)前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチドと相互作用してその生理活性を阻害する若しくは増強する化合物、および/または前記(7)若しくは前記(8)のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する若しくは促進する化合物の同定方法であって、化合物と該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドと化合物とを接触させ、次いで、化合物と該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、化合物が該ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、該ポリペプチドの生理活性または該ポリヌクレオチドの発現を阻害または促進するかどうかを決定する方法、(21)前記(19)または前記(20)の方法で同定された化合物、(22)前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチドと相互作用して脱ユビキチン化活性を阻害する若しくは増強する化合物、または前記(7)若しくは前記(8)のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害する若しくは促進する化合物、(23)前記(4)若しくは前記(5)のポリペプチドおよび/または前記(6)のペプチドからなる、前記(1)若しくは前記(2)のポリペプチドの拮抗剤、(24)前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、前記(3)または前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)または前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、前記(17)または前記(18)の抗体、前記(21)または前記(22)の化合物、および前記(23)の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする医薬組成物、(25)前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、前記(3)または前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)または前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、前記(17)または前記(18)の抗体、前記(21)または前記(22)の

化合物、および前記(23)の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする神経変性疾患の防止剤および/または治療剤、(26)前記神経変性疾患がアルツハイマー病および/またはパーキンソン病である前記(25)の神経変性疾患の防止剤および/または治療剤、(27)前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、前記(3)または前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)または前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、前記(17)または前記(18)の抗体、前記(21)または前記(22)の化合物、および前記(23)の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする筋萎縮症の防止剤および/または治療剤、(28)前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、または前記(7)、前記(8)、前記(11)若しくは前記(12)のポリヌクレオチドを定量的あるいは定性的に測定する方法、(29)前記(1)、前記(2)、前記(4)または前記(5)のポリペプチド、前記(3)または前記(6)のペプチド、前記(7)から前記(12)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(13)または前記(14)の組換えベクター、前記(15)の形質転換体、前記(17)または前記(18)の抗体、および前記(23)の拮抗剤のうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット、からなる。

【0012】

【発明の実施の形態】(新規USP)本発明において提供するヒトUSPは、ヒト脳由来長鎖cDNAライブラリーから、プロテアーゼモチーフを有する遺伝子として選出したcDNAクローンb f 04274がコードする蛋白質である。当該USPは、上記遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを導入した大腸菌で発現させて得た。当該USPは既知USPとそのアミノ酸配列において、相同性の高いCysドメインおよびHisドメインを保有することを除いて、殆ど相同性を有さない新規USPである。当該USP遺伝子は7744塩基からなり(配列表の配列番号2)、そのオープンリーディングフレーム(open reading frame)(ORF)全長は4671塩基、該遺伝子の遺伝子産物は1556アミノ酸残基からなる(配列番号1)。以下、この遺伝子を新規USP遺伝子、該遺伝子の遺伝子産物を新規USPと呼ぶ。新規USP遺伝子のC末端側5618塩基および新規USPのC末端側977アミノ酸残基は、それぞれKIAA1057(GenBankアクセッション番号:AB028980)の遺伝子およびその遺伝子産物と共通である。

【0013】新規USP遺伝子は、遺伝子共発現系で人工基質と共に発現させたとき、該人工基質に作用して脱ユビキチン化活性を示した。一方、新規USPのN末端

から521アミノ酸残基欠失させたもの(KIAA1057-1)と人工基質とをインビトロまたは遺伝子共発現系において反応させたときには、脱ユビキチン化活性は観察されなかった。KIAA1057-1はKIAA1057を含むものである。KIAA1057は、その塩基配列、コードするアミノ酸配列、およびUSPの特徴であるCysドメインおよびHisドメインを有することが既に公開されていた(非特許文献23)。しかし、KIAA1057として公開されているアミノ酸配列を含むKIAA1057-1は脱ユビキチン化活性を示さなかった。すなわち、本発明において新規USPを単離・同定することにより、初めて新規USPが脱ユビキチン化活性を有することを確認でき、酵素活性を有する蛋白質を取得できた。さらに、新規USPには基質選択性があり、人工基質を用いた検討において、アルギニンを経して蛋白質に結合したUbに選択的に作用することを明らかにした。既知USPの中で、このようなUbに選択的に作用するものは知られていない。また、KIAA1057 cDNAが脳、骨格筋、および心臓等で、特に骨格筋で強く発現していることが公開されていることから、新規USP遺伝子も脳および骨格筋等で同様に発現していると考えられる。

【0014】(ポリペプチドまたはペプチド)本発明に係るポリペプチドは、新規USP遺伝子の遺伝子産物であり、該遺伝子を大腸菌等の細胞で発現させて得られたポリペプチドである。ここで、ポリペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドのうち、蛋白質等の長鎖ペプチドを意味し、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチドを単にペプチドという。本明細書においてはアミノ酸を3文字表記または1文字表記することもある。

【0015】本発明に係るポリペプチドの1態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。別の1態様は、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含有するポリペプチドである。

【0016】また別の1態様は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと、アミノ酸配列上で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するポリペプチドである。より好ましくは、配列表の配列番号1に記載のポリペプチドと同等の活性、例えば脱ユビキチン化活性を有するポリペプチドである。脱ユビキチン化活性は、例えば後述する実施例に示したように、ヒトユビキチンのC末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)をアルギニン、イソロイシン、メチオニン、またはプロリンを経して結合させたものを基質として用い、該基質からユビキチンを解離させ得るか否かを、ユビキチン解離後のGSTを

抗GST抗体によるイムノブロットング法等の公知の方法で検出することにより測定できる。さらに好ましくは、アルギニンを介してUbが結合した基質に選択的に作用して脱ユビキチン化活性を示すポリペプチドである。アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、cDNAの塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等が利用できる。なお、ヒト以外の動物種の相同遺伝子産物も当然本発明の範囲に包含される。

【0017】さらに、このように特定されたポリペプチドを基にして、脱ユビキチン化活性を指標にすることにより、1個以上、例えば1個乃至100個、好ましくは1個乃至30個、より好ましくは1個乃至20個、さらに好ましくは1個乃至10個、特に好ましくは1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも提供される。変異を有するペプチドまたはポリペプチドは天然に存在するものであってよく、あるいは変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加、挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、またはポリメラーゼ連鎖増幅法(PCR)を単独または適宜組み合わせ、例えばサimbulック等編、「モレキュラークローニング アラボラトリーマニュアル」, 第2版, コールドスプリングハーバーラボラトリープレス, 1989年、村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」, 丸善株式会社, 1988年、エールリッヒ編、「ピーシーアール(PCR)テクノロジー」, 「DNA増幅の原理と応用」, ストックトンプレス, 1989年等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばウルマー(Ulmer)の技術(「サイエンス(Science)」, 1983年, 第219巻, p. 666-)を利用することができる。

【0018】上記のような変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質(物性、生理活性、または免疫学的活性等)を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等)の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これらのペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【0019】このように、新規USPが有する生理活性と同等の活性、例えば同等の脱ユビキチン化活性を有するポリペプチドが、本発明において提供できる。それら以外にも、活性の強度または基質特異性を変更したポリペプチドが提供できる。

【0020】さらに、配列表の配列番号1に記載のアミ

ノ酸配列からなるポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドも本発明の範囲に包含される。当該部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドは、その最小単位として5個以上のアミノ酸、好ましくは8個以上のアミノ酸、より好ましくは12個以上、さらに好ましくは15個以上の連続するアミノ酸からなるものである。例えば、新規USPが有する生理活性の最小活性単位（領域またはドメイン）からなるポリペプチドまたはペプチドも本発明において提供される。上記部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドは、新規USPまたは新規USPと同等の生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を有する上記ポリペプチドの活性を調節する物質として、あるいは当該生理活性を調節する物質の同定等に使用する試薬として有用である。

【0021】具体的には例えば、上記部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドは、新規USPまたは新規USPと同等の生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を有する上記ポリペプチドの拮抗物質として使用できる。例えば、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのN末端第1番目のアミノ酸残基から第521番目のアミノ酸残基までの521個のアミノ酸残基からなるポリペプチド（配列表の配列番号3）は、この部位を欠失させると配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの脱ユビキチン化活性が消失すること、またユビキチン特異プロテアーゼ（UBP）のN末端側配列が基質認識に関与するという報告（非特許文献15）があることから、新規USPの基質認識に関与していると考えられる。基質認識部位を有しているが酵素活性部位を持たないこのようなポリペプチドは、それが由来した酵素の拮抗剤として用いることができる。従って、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、新規USPまたは新規USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの拮抗剤として、それらの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性の阻害に使用できる。

【0022】新規USPまたは新規USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチドは、配列表の配列番号3に記載のポリペプチドに限定されず、これらポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害できるポリペプチドであればよく、例えば、配列表の配列番号3に記載のポリペプチドとアミノ酸配列上で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有し、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは該ポリペプチドと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害できるポリペプチドが挙げられる。さらに、例えば配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを基にして、脱ユビキチン化活性の

阻害能を指標にすることにより、1個以上、例えば1個乃至100個、好ましくは1個乃至30個、より好ましくは1個乃至20個、さらに好ましくは1個乃至10個、特に好ましくは1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも提供できる。欠失、置換、付加、あるいは挿入は上記同様の手段が使用できる。

【0023】またさらに、新規USPまたは新規USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチドの部分ペプチドであって、当該生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するペプチドも本発明の範囲に含まれる。

【0024】新規USPまたは新規USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するポリペプチドまたはペプチドは、脱ユビキチン化活性を測定する実験系において、脱ユビキチン化活性の阻害を検討することにより得られる。該実験系としては、例えば後述する実施例に示したように、ヒトユビキチンのC末端にグルタチオン—S—トランスフェラーゼ（GST）をアルギニン、イソロイシン、メチオニン、またはプロリンを介して結合させたものを基質として用い、該基質からユビキチンを解離させ得るか否かを、ユビキチン解離後のGSTを抗GST抗体によるイムノブロッティング法等の公知の方法で検出する実験系を使用できる。

【0025】また、上記部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドのうち免疫学的に認識され得るペプチドは、例えばエピトープペプチドであれば、後述するように新規USPに特異的な抗体を作製するための抗原として単独でまたはキャリア（例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたは卵白アルブミン）と結合して使用できる。

【0026】本発明の範囲には、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドに、別種の蛋白質または物質、例えばキャリア等を結合したものも包含される。例えば、本発明に係るポリペプチド等の検出または精製を容易にするために、あるいは別の機能を付加するために、そのN末端側やC末端側に別種の蛋白質またはペプチド、例えばグルタチオン—S—トランスフェラーゼ（GST）、ルシフェラーゼ、GFP、 β -ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、またはFlag-tag等が、直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に遺伝子工学的的手法等を用いて付加されたものであってもよい。

【0027】（ポリヌクレオチド）本発明は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖を提供する。例えば、本発明に係るポリヌクレオチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌク

レオチドまたはその相補鎖である。好ましくは、配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖である。さらに本発明に係る配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその相補鎖、好ましくは配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖も本発明の範囲に含まれる。

【0028】さらに本発明は、上記ポリヌクレオチドまたはその相補鎖、好ましくは配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の対応する領域にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサムブルック等編、「モレキュラークロニング ア ラボラトリーマニユアル」、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、1989年等に従うことができる。これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖にハイブリダイゼーションするものであれば必ずしも相補的配列でなくとも良い。

【0029】また本発明に係るポリヌクレオチドは、上記ポリヌクレオチドの指定された塩基配列領域に対応する連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上の配列からなるポリヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチドまたはそれらの相補鎖を包含する。

【0030】これらのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチド等の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬または標準品としても利用できる。例えば、新規USPをコードする核酸、例えばその遺伝子またはmRNAの検出のためのプローブまたはプライマーとして、あるいは遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として利用できる。その意味で、本発明に係るポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包含する。ここで、新規USPまたは該USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの選別は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して発現蛋白質の確認を行い、その生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を指標にして行うことができる。公知の蛋白質発現系としては、例えば、胚芽または家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用した無細胞蛋白質発現系（「ネイチャー (Nature)」, 1957年, 第179巻, p. 160-161）を例示できる。

【0031】（組換えベクター）上記ポリヌクレオチドを適当なベクターDNAに組み込むことにより、組換えベクターが得られる。用いるベクターDNAは、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクターD

NAは、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、染色体、エピソードおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソード由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等が挙げられる。また、目的により発現ベクターやクローニングベクター等を用いることができる。

【0032】組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等、とを構成要素とし、これらを自体公知の方法により組み合わせて作製される。前記ベクターDNAに本発明に係るポリヌクレオチドを組み込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、適当な制限酵素を選択、処理してDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的のポリヌクレオチドに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。

【0033】（形質転換体）上記ポリヌクレオチドが組み込まれたベクターDNAを、自体公知の宿主に自体公知の方法で導入することにより形質転換体を得られる。宿主としては、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、または動物細胞等が例示できる。遺伝子の導入を行う場合、より好ましい系としては遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。ベクターDNAの宿主細胞への導入は、例えば、サムブルック等編、「モレキュラークロニング ア ラボラトリーマニユアル」、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、1989年等に記載されている標準的な方法により行うことができる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプ負荷 (scrape loading)、バリスティック導入 (ballistic introduction)、および感染等が挙げられる。

【0034】また、形質転換体に導入するベクターDN

Aとして発現ベクターを使用すれば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを提供可能である。上記ポリヌクレオチドが組み込まれた発現ベクターDNAを導入した形質転換体は、各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、形質転換体により発現される本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの作用、例えば少なくとも脱ユビキチン化活性等、あるいは宿主中で産生されたまたは宿主外に産生された該ポリペプチドまたは該ペプチドの量を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養を行ってもよい。

【0035】(ポリペプチドまたはペプチドの製造) 本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは、上記ベクターまたは形質転換体を利用して上記のように遺伝子工学的技術で製造可能である。また、通常のペプチド化学において知られる方法でも製造できる。例えば、「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年や「ペプチド シンテシス (Peptide Synthesis)」, インターサイエンス (Interscience), ニューヨーク (New York), 1996年に記載の方法が例示できるが、無論既知の方法が広く利用可能である。

【0036】本発明に係るポリペプチドまたはペプチドの精製および回収は、その生理活性、例えば少なくとも脱ユビキチン化活性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組み合わせるか、溶解度差に基づく硫酸、アルコール等の分画手段によって精製回収できる。好ましくは、回収しようとするポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列の情報に基づき、これらに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作製し、該抗体を用いて特異的に吸着回収する方法を使用する。

【0037】(抗体) 抗体は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを抗原として用いて作製する。抗原は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチド、あるいはそれらの断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。新規USPに特異的な抗体を作製するためには、USPファミリー間の保存領域以外の新規USPに固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが好ましい。抗原として用いるポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列は、必ずしもポリペプチドまたはペプチド、例えば配列表の配列番号1若しくは配列番号3に記載のアミノ酸配列または該配列中の連続するアミノ酸配列からなる部分配列と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は、免疫学的に新規USPまたはその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド

を、結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。

【0038】抗体を産生するためには、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを、アジュバントの存在下または非存在下に、単独または担体に結合して動物に投与し、体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害な作用を及ぼさずかつ抗原性を増強せしめるものであれば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン、キーホールリンベットヘモシアニン (KLH) 等が例示される。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント (FCA)、フロイント不完全アジュバント (FIA)、Ribi (MPL)、Ribi (TDM)、Ribi (MPL+TDM)、百日咳ワクチン (*Bordetella pertussis* vaccine)、ムラミルジペプチド (MDP)、アルミニウムアジュバント (ALUM)、およびこれらの組み合わせが例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

【0039】ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得される。好ましい手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法により得られる。

【0040】モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞 (例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球) を回収し、自体公知の永久増殖性細胞 (例えば、P3-X63-Ag8株等のミエローマ株) への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作製してこれをクローン化し、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

【0041】かくして得られた上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを認識して結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドの、精製用抗体、試薬、または標識マーカー等として利用できる。例えば、上記ポリペプチドまたは上記ペプチドを認識して結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のうち、直接本発明に係る新規USPに結合してその脱ユビキチン化活性を阻害する抗体は、USPの異常に起因する各種疾患の解明、防止および／または治療に有用である。

【0042】(スクリーニング) 本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドまたはその相補鎖

を組み込んだベクター、該ベクターを導入してなる形質転換体、これらを用いる蛋白質発現系、並びに該ポリペプチドまたは該ペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組み合わせることによって、新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの活性阻害剤または活性増強剤の同定に有効な方法を提供する。また、これらは、新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現阻害剤または発現促進剤の同定に有効な方法を提供する。該方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。本発明の同定方法によれば、例えば、新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの立体構造に基づくドッキングデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現調整剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が可能である。

【0043】例えば、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを用いて、被検化合物とこれらポリペプチドまたはペプチドとの間の相互作用を可能にする条件を選択し、該条件下でこれらポリペプチドまたはペプチドと該化合物とを接触させて、その相互作用により生じるシグナルの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を増強する化合物または阻害する化合物を同定可能である。

【0044】また、新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと被検化合物との間の相互作用を可能にする条件を選択し、該条件下で該ポリヌクレオチドと該化合物とを接触させて、その相互作用により生じるシグナルの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、該ポリヌクレオチドに結合する化合物を同定可能である。

【0045】さらにまた、本発明に係る形質転換体を用いて、被検化合物または上記同定された化合物とを適当な条件下で接触させ、本発明に係る新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現の有無または変化を検出することにより、これらポリペプチドの発現を阻害する化合物または促進する化合物を同定可能である。これらポリペプチドの発現の有無または変化の検出は、簡便には、発現されるポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を指標にして実施できる。脱ユビキチン化活性の測定は、例えば人工基質 Ub-R-GST の分解により生じる GST の測定により可能である。このような同定方法においては、これらポリペプチドの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害する化合物または増強する化合物も同定できる。あるいは、新規 USP の発現の有無または変化を検出す

るために、検出のためのシグナルまたはマーカーを使用する自体公知の系を導入し、このシグナルまたはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出してもよい。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼやグリーン蛍光蛋白質 (GFP) 等、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子等、または検出用のタグ、例えば 6×His タグ等、公知のものが利用できる。これらのシグナルまたはマーカーを組み込んだベクターを作製し、該ベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を作製すればよい。これらのシグナルまたはマーカーの検出方法は、当業者には周知のものである。

【0046】具体的には、例えば、後述する実施例に準じて、新規 USP と基質とを例えば大腸菌で共遺伝子発現させて該 USP の脱ユビキチン化活性を測定する実験系において、ここに被検化合物を加えることにより、該 USP の発現または生理活性を阻害する、促進する、または増強する化合物を同定できる。この実験系は、同定方法の 1 つを説明するものであり、本発明に係る化合物の同定方法はこれに限定されない。

【0047】(化合物) 上記方法により同定された化合物は、新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの活性、例えば脱ユビキチン化活性の阻害剤、拮抗剤、または増強剤の候補化合物として利用可能である。また、遺伝子レベルでの新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現に関する阻害剤または促進剤の候補化合物としても利用可能である。これらの候補化合物は、新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現や生理活性、例えば脱ユビキチン化活性の増加、減少または欠失等に起因する各種病的症状の防止効果および／または治療効果を期待できる。後述するように、USP と神経変性疾患や筋萎縮症との関連が報告されていることから (非特許文献 22)、これらの疾患の防止剤および／または治療剤として使用できる。

【0048】(医薬組成物) かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮してさらに選別することにより、医薬組成物として調製可能である。また本発明に係る新規 USP およびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含むベクター、並びに新規 USP およびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を新規 USP または該 USP と同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現や生理活性、例えば脱ユビキチン化活性の増加、減

少または欠失等に起因する各種病的症状の防止および／または治療に使用できる。すなわち本発明は、これらを単独または複数組み合わせる使用することにより、これらのうち少なくとも1つを含有する医薬組成物を提供する。なお、製剤化に当たっては、自体公知のポリペプチド、ペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、抗体等各対象に応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0049】本発明に係る新規USPまたは該USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現および／またはその生理活性の減少や欠失等に起因する異常な症状の治療には、1つの方法として当該USP自体または当該USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性を増強する化合物（増強剤）および／または当該USPをコードする遺伝子の発現を促進する治療上有効量の化合物（促進剤）を医薬上許容される担体とともに投与し、そのことにより異常な症状を改善することを特徴とする方法が挙げられる。あるいは、遺伝子治療を用いて、対象中の細胞内で新規USPまたは該USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの活性を生成なすしめてもよい。上記ポリヌクレオチドを利用した遺伝子治療は、公知の方法が利用できるが、例えば、上記のごとく本発明に係るポリヌクレオチドを組み入れた複製欠損レトロウイルスベクターを作製して遺伝子治療に利用すればよい。また、例えば、蛋白質をコードしているDNAまたはRNAを用いて、例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いることによりエクスピオ（*ex vivo*）において対象由来の細胞を処理し、次いで、細胞を対象に導入することもできる。

【0050】本発明に係る新規USPまたは該USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現および／またはその生理活性が過剰な場合、有効量の上記阻害剤化合物を医薬上許容される担体とともに対象に投与して新規USPまたは該USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの生理活性を阻害し、そのことにより異常な症状を改善することもできる。例えば新規USPの部分ポリペプチドまたはペプチドであって新規USPの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するものを、新規USPの拮抗剤として使用できる。具体的には、例えば配列表の配列番号3に記載のポリペプチドを医薬上許容される担体とともに対象に投与することにより、新規USPの生理活性を阻害できる。あるいは、新規USPの部分ポリペプチドまたはペプチドであって新規USPの生理活性、例えば脱ユビキチン化活性を阻害するもの、例えば配列番号3に記載のポリペプチドを、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて遺伝子治療により、上記のように対象中の細胞内で生成なすしめてもよい。これにより新規USPまたは新規USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドの発現および／またはその生理活性の過剰に起因する疾患を防止および／または治療できる。該拮抗剤は、上記医薬組

成物の一成分として使用することもできる。

【0051】さらに、発現ブロック法を用いて内在性の新規USPまたは該USPと同等の生理活性を有する上記ポリペプチドをコードしている遺伝子の発現を阻害してもよい。細胞内で生成させた、あるいは別個に投与された当該遺伝子のアンチセンス配列を使用して当該遺伝子の発現を阻害できる。これらのオリゴヌクレオチドは、上記本発明に係るポリヌクレオチドを基にして設計し合成できる。当該オリゴヌクレオチドはそれ自体投与することができ、あるいは関連オリゴマーをインビボで発現させることもできる。

【0052】投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方うまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩、フシジン酸、または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与を用いることもできる。局所的な投与のときは、膏薬、パスタ、ゲル等の形態を利用できる。

【0053】必要な用量範囲は、新規USPおよびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドまたはその相補鎖を含むベクター、新規USPおよびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体、上記化合物、上記拮抗剤、および上記医薬組成物の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重1 kgあたり0.1乃至100 μ gの範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0054】製剤化にあたっては、例えばペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、抗体、化合物等各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リボソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリン等の包接体等の製剤化方法が利用できる。

【0055】散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトール等の賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

【0056】懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビト

ール、フラクトース等の糖類、PEG等のグリコール類、油類を使用して製造できる。

【0057】注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

【0058】リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルム等）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

【0059】脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油等の植物油、MCT等）、乳化剤（リン脂質等）等を混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型等）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖等）が例示される。

【0060】シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水等に加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

【0061】USPの発現や生理活性の増加、減少、または欠失等の機能障害は、USPに係るユビキチンシステムの異常をきたし、ひいては病的症状を引き起こす。例えば、USPの異常と発癌や神経変性疾患との関連が示唆されている（非特許文献17～19）。USPは染色体構造の維持にも関与しており、ユビキチン化されたヒストンの脱ユビキチン化が染色体凝集に重要であることが知られている（非特許文献20）し、USPファミリーの1つであるUSP16がH2Aを脱ユビキチン化することが報告されている（非特許文献21）。また、アルツハイマー病やパーキンソン病で観察される蛋白質凝集体の多くが抗ユビキチン抗体に反応することからも（非特許文献17）、神経変性疾患とUSPの機能異常の関係が示唆される。また、ユビキチン経路が筋萎縮症と関連していることについても報告されている（非特許文献22）。上記本発明に係るUSPは、脳および骨格筋、殊に骨格筋での発現が比較的高く、当該USPが神経変性疾患や筋萎縮症と関連している可能性が高い。従って、本発明は、USPの関与する生体機能の解明、例えば発癌プロセスの解明、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病やパーキンソン病等の解明、および筋萎縮症の解明、並びにそれらの防止剤および／または治

療剤の開発、およびそれらの診断手段として用いる測定法の開発を可能とするものであり、非常に有用である。

【0062】（診断のための測定方法および試薬）本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチド、本発明に係るポリヌクレオチドおよびその相補鎖、並びに当該USPおよびその由来物からなるポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体は、診断マーカーや試薬等として、本発明に係る新規USPおよびその由来物であるポリペプチド、またはこれらをコードするポリヌクレオチドを定量的にまたは定性的に測定する方法に使用できる。また本発明は、これらのうちの1種またはそれ以上を充填した、1個またはそれ以上の容器を含んでなる試薬キットも提供する。当該試薬キットは、上記同定方法および上記測定方法に使用できる。製剤化にあたっては、自体公知のポリペプチドまたはペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、または抗体等それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。上記測定方法によれば、新規USPの発現や活性の増加、減少または欠失等が関連する各種病的症状診断が可能になる。

【0063】本発明に係る新規USPおよびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの発現または生理活性の異常に起因する疾患の診断手段は、例えば当該USPをコードしている核酸との相互作用や反応性を利用して、相応する核酸の存在量を決定すること、および／または当該USPについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該USPの存在、個体由来の試料中の存在量を決定することによって行われる。詳しくは、新規USPを診断マーカーとして検定するのである。試料中の当該USPの検出またはその存在量の決定に用いることができる測定法は当業者に周知である。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンブロット分析、およびELISAアッセイ等がある。また、本発明に係る新規USPをコードするポリヌクレオチドの検出法および定量法としては、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNAアーゼ保護、ノーザンブロットング、およびその他のハイブリダイゼーション法を用いてRNAレベルで測定することができる。

【0064】測定される試料として、個体由来の細胞、例えば血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等を挙げることができる。また、測定される核酸は、上記各試料から自体公知の核酸調製法により得られる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCRまたはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅DNAを標識した上記USPをコードするDNAにハイブリダイゼーションさせるこ

とにより点突然変異を同定することができる。

【0065】上記測定により本発明に係るUSPおよび該USPをコードするDNAの変異、減少、または増加を検出することにより、当該USPの異常に起因する疾患、例えば、癌あるいは神経変性疾患等、例えばアルツハイマー病やパーキンソン病等の診断が可能になる。

【0066】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【実施例1】（新規USP遺伝子の単離・同定）本発明に係るUSP遺伝子は、かずさDNA研究所のヒト長鎖cDNA解析情報データベースから、バイオインフォマティクス（bioinformatics）により、新規プロテアーゼ候補遺伝子として抽出した。本遺伝子の3'末端領域の塩基配列はcDNAクローンKIAA1057（GenBankアクセッション番号：AB028980）と共通の配列であった。cDNAクローンKIAA1057は、977個のアミノ酸をコードする領域を含む5618bpを含有するクローンであり、USPに特徴的なモチーフであるCysドメイン（Cys-box）（G-[LIVMFY]-x（1,3）-[AGC]-[NASM]-x-C-[FYW]-[LIVMFC]-[NST]-[SACV]-x-[LIVMS]-Q）とHisドメイン（His-box）（Y-x-L-x-[SAG]-[LIVMFT]-x（2）-H-x-G-x（4,5）-G-H-Y）およびアスパラギン酸（Asp）ドメインを有する。本発明に係る遺伝子は、Cysドメイン内において既知の当該ドメイン配列と一致していないアミノ酸残基が1つ存在する。

【0067】cDNAクローンKIAA1057はそのORF内の5'末端領域が欠失してクローニングされていると推定されたため、KIAA1057の塩基配列を基に、さらに上記データベースを検索した。その結果、KIAA1057の塩基配列を含むcDNAクローンbf04274を見出した。

【0068】bf04274は7744bpからなるcDNAである。その塩基配列の第389位～第391位に存在する最初のATGは、その直前にコザックのコンセンサス配列を持つことから、翻訳開始コドンと予測された。すなわち、bf04274は、1556個のアミノ酸残基からなるポリペプチドをコードする翻訳領域（CDS）をその塩基配列の第389位～第5059位に含む。bf04274の塩基配列を配列表の配列番号2に、bf04274がコードするアミノ酸配列を配列番号1に記載した。KIAA1057はbf04274の塩基配列のうち第2124位から第7741位までの塩基配列に相当し、KIAA1057の推定アミノ酸配列は、bf04274がコードするアミノ酸配列の第580番目から第1556番目のアミノ酸配列に相当す

る。Cys-boxおよびHis-boxは、bf04274がコードするアミノ酸配列の第626番目～第641番目および第890番目～第907番目のアミノ酸配列に存在する。

【0069】

【実施例2】（新規USPの発現）実施例1で単離・同定した新規USPをコードするcDNAクローンbf04274発現プラスミドをゲイトウェイ™_クローニング_テクノロジー（Life Technologies社）を用いて作製した。まず、bf04274クローン（pBC SK+のHindIII-SacI部位に挿入）を鋳型として、アドバンテージ-HF2_PCRキット（Clontech社）あるいはExpand_high-fidelity_PCR_system（Roche社）を用いて推定CDS領域（配列番号2に記載の塩基配列の第389位～第5059位）を2段階PCRで増幅した後、BPクローナーゼエンザイム（BP clonase enzyme）を用いた組換え反応によりエントリーベクター（pDONR201）に挿入し、pDONR-bf04274を作製した。なお、プライマーは、1段階目のPCR用にbf04274-AttB（配列番号5）とPrDONR1057（-）（配列番号6）とを、2段階目のPCR用にAttB1アダプタープライマー（配列番号7）と上記PrDONR1057（-）とを使用した。次に、pDONR-bf04274とN-末端His-タグ付加蛋白質（N-terminal His-tagged protein）発現用ベクターであるpDEST17とを用いて、LRクローナーゼエンザイムによる組換え反応によりHis-タグ付加bf04274発現プラスミド（pHis-04274）を作製した。発現プラスミドは、NaClにより発現誘導が可能なE. coli BL21-SI（Life Technologies社）に導入した。CDSの塩基配列が正しく挿入されていることは、シーケンスを行なって確認した。シーケンス反応はビッグダイ_ターミネーター_サイクル_シーケンシング_FS_レディ_リアクション_キット（BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（PE biosystems社））を用い、泳動および解析はABI PRISM310を用いて実施した。

【0070】上記作製した発現プラスミドを用いて大腸菌でbf04274の発現誘導を行った。LBON/Amp培地（50mg/mlのアンピシリンを含み、NaClを含まないLB培地）に1/10量の大腸菌前培養液を接種し、37℃にてOD₆₀₀が約1.0前後になるまで培養後、NaClを終濃度0.3Mになるように添加した。さらに約4～5時間培養後、菌体を回収した。菌体をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁した

後に超音波処理し、遠心処理により上清を回収して抽出液とした。該抽出液を10%SDS-PAGEにより分離後、抗His-タグ抗体 (Penta-HisTM 抗体、QIAGEN社) を用いてイムノブロットングを行った。その結果、推定アミノ酸配列から予測される分子量と同じ分子量の蛋白質 (186.8 kDa) を検出した。発現蛋白質はその多くが不溶性画分に認められ、可溶性画分への分布は少量であった。なお、検出にはECLウエスタンブロットング検出キット (western blotting detection kit) (Amersham pharmacia biotech社) を使用した。

【0071】

【実施例3】 (bf04274の脱ユビキチン化活性) bf04274がコードする蛋白質について、基質との共発現系で、その脱ユビキチン化活性を検討した。この実験系は、酵素発現用プラスミドが有するpBR322系のoriとコンパティビリティを示すp15Aのoriを有する基質発現用プラスミドを使用することにより、酵素と基質を同一菌体内で共発現させるものである (「アーチーブス オブ バイオケミストリー アンド バイオフィジックス (Archives Of Biochemistry And Biophysics)」, 2000年, 第379巻, p. 198-)。

【0072】まず、共発現用の各種基質発現プラスミドを構築した。基質は、ヒトユビキチンのC末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を結合させた人工基質Ub-GSTを用いた。pTV118N/Ub-GSTを鋳型としてUb-GSTコード領域をPCRにより増幅させた後、ゲートウェイTM-クローニング_テクノロジーを用いて大腸菌発現用ベクター、pDEST14に挿入し、pDEST14Ub-GSTを作製した。次に、pDEST14Ub-GSTからT7プロモーターおよびUb-GSTコード領域を含む領域をSphIおよびHindIII処理により切り出し、p15A由来のoriを持つpACYC184 (ニッポンジーン社) のSphI-HindIII間に組み込み、pACUb-M-GSTを作製した。これを共発現用Ub-M-GST発現プラスミドとした。次に、pACUb-M-GSTをSalIおよびHindIIIで処理し、T7プロモーターおよびUb-GSTコード領域を含む領域をpBluescriptII SK (-) (Stratagene社) のSalI-HindIII間に組み込み、pBSUbGSTを作製した。さらに、pBSUbGSTを鋳型として、クイックチェンジ_サイト-ディレクティブ_ミュータジェネシス_キット (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit) (Stratagene社) を用いてGSTのN末端のアミノ酸に対応するコドンにATG (メチオニン: M) から、CCG

(プロリン: P)、ATC (イソロイシン: I)、またはCGT (アルギニン: R) に変換したpBSUb-P-GST、pBSUb-I-GST、またはpBSUb-R-GSTを作製した。コドンの変換は、シーケンシングにより確認した。以下、Ub-M-GST、Ub-R-GST、Ub-P-GST、およびUb-I-GSTを総称するときは、Ub-X-GSTという。次に、各pBSUb-X-GSTをHindIIIおよびSphIで処理し、T7プロモーターおよびUb-X-GSTコード領域を含む領域をpACYC184のHindIII-SphI間に組み込み、各共発現用Ub-X-GST発現プラスミド、pACUb-X-GSTを作製した。作製した4種類のpACUb-X-GSTはE. coli BL21-SIに導入し、塩化カルシウム法によりコンピテントセル化した。

【0073】各pACUb-X-GSTをそれぞれ保持するE. coli BL21-SIコンピテントセルに、実施例2で作製したプラスミドpHis-04274を遺伝子導入した。このとき、一部のコンピテントセルには、pHis-04274の代わりに、陽性コントロールとして既知ユビキチン特異プロテアーゼ15 (以下、USP15と略称する) cDNA (KIAA0529クローン) を鋳型として実施例2に記載の方法で作製したHis-タグ付加USP15発現プラスミド (pHis-USP15)、または陰性コントロールとしてHis-タグ付加ルシフェラーゼ (Luc) 発現プラスミド (pHis-Luc) をそれぞれ遺伝子導入した。該遺伝子導入されたコンピテントセルを、50 mg/ml アンピシリンおよび34 mg/ml クロラムフェニコールを含むLBON (NaClを含まないLB培地) プレート上にて培養し、各種共発現株を選択して得た。なお、pHis-USP15の作製において、KIAA0529はUSP15のN末端3アミノ酸残基 (MAE) が欠失していたため、ベーカーらの方法に従い (「ゲノミクス (Genomics)」, 1999年, 第59巻, p. 264-)、この3アミノ酸残基に対応するコドンをプライマー内に設計し、完全なCDSとした。また、pHis-Lucは、pGL3-Lucベクター (Promega社) を鋳型として、実施例2と同様にゲートウェイTM-クローニング_テクノロジーを用いて作製した。

【0074】上記各種共発現株を50 mg/ml アンピシリンおよび34 mg/ml クロラムフェニコールを含むLBON培地中でOD₆₀₀が約0.5~1.2になるまで37℃にて培養後、NaClを終濃度0.3Mになるように添加した。さらに約4または5時間培養後、菌体を回収した。該菌体を培養液の1/10量の50 mM Tris-HCl, pH7.6/5 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)/1 mM ジチオスレイトール (DTT) に懸濁後、超音波処理により破壊し、遠

心処理により上清を回収して大腸菌抽出液を調製した。該抽出液を15% SDS-PAGEにより分離し、1次抗体として抗GST抗体 (Amersham pharmaceutical biotech社)、2次抗体としてホースラディッシュ__パーオキシダーゼ (HRP) 標識抗ヤギ抗体 (Alpha diagnostic international社) を用いてイムノブロットングを行い、Ub-X-GSTおよび遊離したGSTを検出した。なお、検出はECLウェスタンブロットング検出キットを使用した。

【0075】その結果、図1に示すように、プラスミド pHis-04274 と Ub-R-GST とを共発現させた大腸菌から調製した抽出液では、Ub-R-GST 以外に、Ub-R-GST から Ub が加水分解されて生じた GST が検出された。しかし、Ub-M-GST、Ub-P-GST、または Ub-I-GST との共発現系では、GST が検出されなかった。一方、陽性コントロールである USP15 を、bf04274 の代わりに基質と共発現させたときには上記4種類の基質のいずれに対しても脱ユビキチン化活性が認められたが、陰性コントロールであるルシフェラーゼでは認められなかった。

【0076】このようにプラスミド pHis-04274 により発現された蛋白質は、Ub がアルギニン (R) 残基を介して蛋白質に結合している人工基質に対して基質選択性を示した。既知 USP について同様に基質選択性を検討したが、Ub-R-GST に対する基質選択性を示すものは、本発明に係る新規 USP のみであった。Ub-GST は、Ub が蛋白質 (GST) とペプチド結合していることから、前駆体 Ub モデルと考えられる。bf-04274 がコードする蛋白質は、Ub-GST を基質として Ub を解離するため、生体内において前駆体 Ub からの Ub 生成に関与している可能性がある。

【0077】

【実施例4】(bf-04274 がコードする蛋白質の酵素活性部位の特定) USP はシステインプロテアーゼの1つであり、Cys-box 内に存在するシステイン残基が活性部位であると考えられている。そこで、bf04274 がコードする蛋白質の推定活性残基である第634番目のシステイン (C) をセリン (S) に置換した変異体 (bf04274^{C634S}) を作製した。まず、第634番目のシステインをクイックチェンジ__サイト__ディレクティド__ミュータジェネシス__キットを用いてセリンに置換した。使用したプライマーは、第634番目のシステインのコドンである TGT がセリンのコドンである TCT に置換するように設計した (配列番号8)。変異の導入をシーケンシングにて確認し、His-タグ付加 bf04274^{C634S} 発現プラスミド、pHis-04274 Mut を得た。シーケンス反応は Cy5__サーモシーケナーゼ__ダイ__サーミネータ

__キット (ThermoSequenase Dye Terminator Kit) を用い、泳動および解析はロング__リード__タワー (Long Read Tower) (いずれも Amersham pharmaceutical biotech社) を用いて実施した。

【0078】pHis-04274 Mut、実施例2または実施例3で作製した pHis-04274、pHis-USP15、あるいは pHis-Luc をそれぞれ、実施例3と同様に pACUb-R-GST と共に大腸菌で共発現させた。その結果、図2に示すように、bf04274 を発現させたときに認められた Ub-R-GST に対する脱ユビキチン化活性が、bf04274^{C634S} においては消失していることが判明した。すなわち、bf04274 がコードする蛋白質は、第634番目のシステイン残基を活性部位とするシステインプロテアーゼであることが確認された。

【0079】

【実施例5】(KIAA1057-1 がコードする遺伝子産物の脱ユビキチン化活性の検討) bf04274 の N 末端側を 521 アミノ酸残基 (配列番号3) 欠失させたポリペプチドをコードする KIAA1057-1 を含むプラスミドを実施例2と同様の方法で作製し、実施例3と同様の方法で基質と共に大腸菌で共発現させてその脱ユビキチン化活性を検討した。その結果、KIAA1057-1 は、USP ファミリーの特徴である Cys-Box および His-Box を保有しているが、4種類の人工基質それぞれとの共発現系において、脱ユビキチン化活性を示さなかった (図3)。以上の結果から、bf04274 がコードする蛋白質の N 末端側には、文献 (非特許文献15) に記載された USP と同様に、基質の認識に関与する部位が存在すると考えられる。

【0080】

【発明の効果】かずさ DNA 研究所のヒト長鎖 cDNA 解析情報データベースから、バイオインフォマティクス (bioinformatics) により、新規プロテアーゼ候補遺伝子として bf04274 を抽出し、本遺伝子の遺伝子産物がユビキチン化蛋白質を脱ユビキチン化するユビキチン特異プロテアーゼ (USP) の1つであることを見出した。さらに、本発明に係る USP は、N 末端から 521 アミノ酸残基を欠失させると脱ユビキチン化活性が消失することを見出した。本発明は、USP の関与する生体機能の解明、例えば、発癌プロセスの解明、筋萎縮症、および神経変性疾患、例えばアルツハイマー病やパーキンソン病等の解明、並びにそれらの防止、治療、および診断を可能にするものであり、非常に有用である。

【0081】

【配列表フリーテキスト】

配列番号5: プライマーとして用いるために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 6 : プライマーとして用いるために設計された
オリゴヌクレオチド。

配列番号 7 : プライマーとして用いるために設計された
オリゴヌクレオチド。

配列番号 8 : プライマーとして用いるために設計された
オリゴヌクレオチド。

【 0 0 8 2 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE

<120> A Novel ubiquitin specific protease

<130> NP02-1095

<140>

<141>

<150> JP P2001-301800

<151> 2001-09-28

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1556

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Glu Gln Glu Lys Ser Leu Pro Gly Val Val Met Ala Leu Val Cys
  1              5              10              15
Asn Val Phe Asp Met Leu Tyr Gln Leu Ala Asn Leu Glu Glu Pro Arg
          20              25              30
Ile Thr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Leu Leu Ile Pro Thr Asp Pro
          35              40              45
Ala Ile Gln Glu Ala Leu Asp Gln Leu Asp Ser Leu Gly Arg Lys Lys
          50              55              60
Thr Leu Leu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Ser Ser Lys Ser Pro Ser Leu
          65              70              75              80
Ser Ser Lys Gln Gln His Gln Pro Ser Ala Ser Ser Ile Leu Glu Ser
          85              90              95
Leu Phe Arg Ser Phe Ala Pro Gly Met Ser Thr Phe Arg Val Leu Tyr
          100             105             110
Asn Leu Glu Val Leu Ser Ser Lys Leu Met Pro Thr Ala Asp Asp Asp
          115             120             125
Met Ala Arg Ser Cys Ala Lys Ser Phe Cys Glu Asn Phe Leu Lys Ala
          130             135             140
Gly Gly Leu Ser Leu Val Val Asn Val Met Gln Arg Asp Ser Ile Pro
          145             150             155             160
Ser Glu Val Asp Tyr Glu Thr Arg Gln Gly Val Tyr Ser Ile Cys Leu
```


165										170					175				
Gln	Leu	Ala	Arg	Phe	Leu	Leu	Val	Gly	Gln	Thr	Met	Pro	Thr	Leu	Leu				
180										185					190				
Asp	Glu	Asp	Leu	Thr	Lys	Asp	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Ser	Ser	Arg	Pro				
195										200					205				
Phe	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gln	Thr	Ser	Arg	Gln	Met	Ser	Leu	Cys	Gly				
210										215					220				
Thr	Pro	Glu	Lys	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gln	Leu	Ser	Val	Ser	Asp	Arg	Ser				
225										230					235				
Ser	Ile	Arg	Val	Glu	Glu	Ile	Ile	Pro	Ala	Ala	Arg	Val	Ala	Ile	Gln				
245										250					255				
Thr	Met	Glu	Val	Ser	Asp	Phe	Thr	Ser	Thr	Val	Ala	Cys	Phe	Met	Arg				
260										265					270				
Leu	Ser	Trp	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Arg	Leu	Asp	Leu	Val	Gly	Ser	Ser				
275										280					285				
Gln	Pro	Ile	Lys	Glu	Ser	Asn	Ser	Leu	Cys	Pro	Ala	Gly	Ile	Arg	Asn				
290										295					300				
Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn	Cys	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Gly	Glu				
305										310					315				
Pro	Val	Ala	Leu	His	Ala	Gly	Ile	Cys	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Val	Ser				
325										330					335				
Thr	Lys	Asp	Ser	Leu	Ile	Ala	Gly	Glu	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Thr				
340										345					350				
Cys	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Gln	Gln	Leu	Ala	Ser	Phe	Tyr	Asn	Leu	Pro				
355										360					365				
Cys	Val	Ala	Asp	Phe	Ile	Ile	Asp	Ile	Leu	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser	Ala				
370										375					380				
Glu	Ile	Arg	Arg	Val	Ala	Cys	Asp	Gln	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Gln	Thr				
385										390					395				
Asp	Thr	Ser	Ala	His	Pro	Asp	Val	Gln	Lys	Pro	Asn	Gln	Phe	Leu	Leu				
405										410					415				
Gly	Val	Ile	Leu	Thr	Ala	Gln	Leu	Pro	Leu	Trp	Ser	Pro	Thr	Ser	Ile				
420										425					430				
Met	Arg	Gly	Val	Asn	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Gln	Cys	Met	Glu	Tyr	Phe				
435										440					445				
Asp	Leu	Arg	Cys	Gln	Leu	Leu	Asp	Asp	Leu	Thr	Thr	Ser	Glu	Met	Glu				
450										455					460				
Gln	Leu	Arg	Ile	Ser	Pro	Ala	Thr	Met	Leu	Glu	Asp	Glu	Ile	Thr	Trp				
465										470					475				
Leu	Asp	Asn	Phe	Glu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ala	Glu	Cys	Glu	Thr	Ser	Glu				
485										490					495				
Ala	Asp	Asn	Ile	Leu	Leu	Ala	Gly	His	Leu	Arg	Leu	Ile	Lys	Thr	Leu				
500										505					510				
Leu	Ser	Leu	Cys	Gly	Ala	Glu	Lys	Glu	Met	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ile				
515										520					525				
Lys	Pro	Leu	Leu	Asp	Asp	Phe	Leu	Phe	Arg	Ala	Ser	Arg	Ile	Ile	Leu				
530										535					540				
Asn	Ser	His	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Ala	Ala	Ile	Ser	Gln	Gln	Asp	Phe				
545										550					555				
His	Pro	Lys	Cys	Ser	Thr	Ala	Asn	Ser	Arg	Leu	Ala	Ala	Tyr	Glu	Val				

			565					570					575				
Leu	Val	Met	Leu	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Gln	Ile	Ile	Ile		
			580					585					590				
Lys	Glu	Leu	Leu	Ser	Met	His	His	Gln	Pro	Asp	Pro	Ala	Leu	Thr	Lys		
			595					600					605				
Glu	Phe	Asp	Tyr	Leu	Pro	Pro	Val	Asp	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Gly	Phe		
			610					615					620				
Val	Gly	Leu	Arg	Asn	Gly	Gly	Ala	Thr	Cys	Tyr	Met	Asn	Ala	Val	Phe		
			625					630					635				
Gln	Gln	Leu	Tyr	Met	Gln	Pro	Gly	Leu	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Ser	Val		
			645					650					655				
Asp	Asp	Asp	Thr	Asp	Asn	Pro	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Tyr	Gln	Val	Gln		
			660					665					670				
Ser	Leu	Phe	Gly	His	Leu	Met	Glu	Ser	Lys	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Val	Pro		
			675					680					685				
Glu	Asn	Phe	Trp	Lys	Ile	Phe	Lys	Met	Trp	Asn	Lys	Glu	Leu	Tyr	Val		
			690					695					700				
Arg	Glu	Gln	Gln	Asp	Ala	Tyr	Glu	Phe	Phe	Thr	Ser	Leu	Ile	Asp	Gln		
			705					710					715				
Met	Asp	Glu	Tyr	Leu	Lys	Lys	Met	Gly	Arg	Asp	Gln	Ile	Phe	Lys	Asn		
			725					730					735				
Thr	Phe	Gln	Gly	Ile	Tyr	Ser	Asp	Gln	Lys	Ile	Cys	Lys	Asp	Cys	Pro		
			740					745					750				
His	Arg	Tyr	Glu	Arg	Glu	Glu	Ala	Phe	Met	Ala	Leu	Asn	Leu	Gly	Val		
			755					760					765				
Thr	Ser	Cys	Gln	Ser	Leu	Glu	Ile	Ser	Leu	Asp	Gln	Phe	Val	Arg	Gly		
			770					775					780				
Glu	Val	Leu	Glu	Gly	Ser	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Lys	Cys	Lys	Glu		
			785					790					795				
Lys	Arg	Ile	Thr	Val	Lys	Arg	Thr	Cys	Ile	Lys	Ser	Leu	Pro	Ser	Val		
			805					810					815				
Leu	Val	Ile	His	Leu	Met	Arg	Phe	Gly	Phe	Asp	Trp	Glu	Ser	Gly	Arg		
			820					825					830				
Ser	Ile	Lys	Tyr	Asp	Glu	Gln	Ile	Arg	Phe	Pro	Trp	Met	Leu	Asn	Met		
			835					840					845				
Glu	Pro	Tyr	Thr	Val	Ser	Gly	Met	Ala	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Glu		
			850					855					860				
Val	Gly	Glu	Asn	Gly	Arg	Ser	Val	Asp	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro		
			865					870					875				
Arg	Lys	Lys	Val	Ala	Leu	Thr	Glu	Asn	Tyr	Glu	Leu	Val	Gly	Val	Ile		
			885					890					895				
Val	His	Ser	Gly	Gln	Ala	His	Ala	Gly	His	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ile	Lys		
			900					905					910				
Asp	Arg	Arg	Gly	Cys	Gly	Lys	Gly	Lys	Trp	Tyr	Lys	Phe	Asn	Asp	Thr		
			915					920					925				
Val	Ile	Glu	Glu	Phe	Asp	Leu	Asn	Asp	Glu	Thr	Leu	Glu	Tyr	Glu	Cys		
			930					935					940				
Phe	Gly	Gly	Glu	Tyr	Arg	Pro	Lys	Val	Tyr	Asp	Gln	Thr	Asn	Pro	Tyr		
			945					950					955				
Thr	Asp	Val	Arg	Arg	Arg	Tyr	Trp	Asn	Ala	Tyr	Met	Leu	Phe	Tyr	Gln		

	965		970		975
Arg Val Ser Asp Gln Asn Ser Pro Val Leu Pro Lys Lys Ser Arg Val					
	980		985		990
Ser Val Val Arg Gln Glu Ala Glu Asp Leu Ser Leu Ser Ala Pro Ser					
	995		1000		1005
Ser Pro Glu Ile Ser Pro Gln Ser Ser Pro Arg Pro His Arg Pro Asn					
	1010		1015		1020
Asn Asp Arg Leu Ser Ile Leu Thr Lys Leu Val Lys Lys Gly Glu Lys					
	1025		1030		1035
Lys Gly Leu Phe Val Glu Lys Met Pro Ala Arg Ile Tyr Gln Met Val					
	1045		1050		1055
Arg Asp Glu Asn Leu Lys Phe Met Lys Asn Arg Asp Val Tyr Ser Ser					
	1060		1065		1070
Asp Tyr Phe Ser Phe Val Leu Ser Leu Ala Ser Leu Asn Ala Thr Lys					
	1075		1080		1085
Leu Lys His Pro Tyr Tyr Pro Cys Met Ala Lys Val Ser Leu Gln Leu					
	1090		1095		1100
Ala Ile Gln Phe Leu Phe Gln Thr Tyr Leu Arg Thr Lys Lys Lys Leu					
	1105		1110		1115
Arg Val Asp Thr Glu Glu Trp Ile Ala Thr Ile Glu Ala Leu Leu Ser					
	1125		1130		1135
Lys Ser Phe Asp Ala Cys Gln Trp Leu Val Glu Tyr Phe Ile Ser Ser					
	1140		1145		1150
Glu Gly Arg Glu Leu Ile Lys Ile Phe Leu Leu Glu Cys Asn Val Arg					
	1155		1160		1165
Glu Val Arg Val Ala Val Ala Thr Ile Leu Glu Lys Thr Leu Asp Ser					
	1170		1175		1180
Ala Leu Phe Tyr Gln Asp Lys Leu Lys Ser Leu His Gln Leu Leu Glu					
	1185		1190		1195
Val Leu Leu Ala Leu Leu Asp Lys Asp Val Pro Glu Asn Cys Lys Asn					
	1205		1210		1215
Cys Ala Gln Tyr Phe Phe Leu Phe Asn Thr Phe Val Gln Lys Gln Gly					
	1220		1225		1230
Ile Arg Ala Gly Asp Leu Leu Leu Arg His Ser Ala Leu Arg His Met					
	1235		1240		1245
Ile Ser Phe Leu Leu Gly Ala Ser Arg Gln Asn Asn Gln Ile Arg Arg					
	1250		1255		1260
Trp Ser Ser Ala Gln Ala Arg Glu Phe Gly Asn Leu His Asn Thr Val					
	1265		1270		1275
Ala Leu Leu Val Leu His Ser Asp Val Ser Ser Gln Arg Asn Val Ala					
	1285		1290		1295
Pro Gly Ile Phe Lys Gln Arg Pro Pro Ile Ser Ile Ala Pro Ser Ser					
	1300		1305		1310
Pro Leu Leu Pro Leu His Glu Glu Val Glu Ala Leu Leu Phe Met Ser					
	1315		1320		1325
Glu Gly Lys Pro Tyr Leu Leu Glu Val Met Phe Ala Leu Arg Glu Leu					
	1330		1335		1340
Thr Gly Ser Leu Leu Ala Leu Ile Glu Met Val Val Tyr Cys Cys Phe					
	1345		1350		1355
Cys Asn Glu His Phe Ser Phe Thr Met Leu His Phe Ile Lys Asn Gln					

1365 1370 1375
 Leu Glu Thr Ala Pro Pro His Glu Leu Lys Asn Thr Phe Gln Leu Leu
 1380 1385 1390
 His Glu Ile Leu Val Ile Glu Asp Pro Ile Gln Ala Glu Arg Val Lys
 1395 1400 1405
 Phe Val Phe Glu Thr Glu Asn Gly Leu Leu Ala Leu Met His His Ser
 1410 1415 1420
 Asn His Val Asp Ser Ser Arg Cys Tyr Gln Cys Val Lys Phe Leu Val
 1425 1430 1435 1440
 Thr Leu Ala Gln Lys Cys Pro Ala Ala Lys Glu Tyr Phe Lys Glu Asn
 1445 1450 1455
 Ser His His Trp Ser Trp Ala Val Gln Trp Leu Gln Lys Lys Met Ser
 1460 1465 1470
 Glu His Tyr Trp Thr Pro Gln Ser Asn Val Ser Asn Glu Thr Ser Thr
 1475 1480 1485
 Gly Lys Thr Phe Gln Arg Thr Ile Ser Ala Gln Asp Thr Leu Ala Tyr
 1490 1495 1500
 Ala Thr Ala Leu Leu Asn Glu Lys Glu Gln Ser Gly Ser Ser Asn Gly
 1505 1510 1515 1520
 Ser Glu Ser Ser Pro Ala Asn Glu Asn Gly Asp Arg His Leu Gln Gln
 1525 1530 1535
 Gly Ser Glu Ser Pro Met Met Ile Gly Glu Leu Arg Ser Asp Leu Asp
 1540 1545 1550
 Asp Val Asp Pro
 1555

<210> 2
 <211> 7744
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (389)..(5059)

<400> 2
 gatcactata gaggattttt actctgttcc acgaactatt ctacctcatg gtgcctcatt 60
 tcatggacat cttttaaccc ttaatgttac ctatgagtct accaaagata ccttcaactgt 120
 cgagctcac agtaatgaaa ccatagggag tgtccggtgg aaaatagcca agcagttgtg 180
 ctctcctgtg gataatatac agatatttac aaatgatagc ctgctgacag tgaataaaga 240
 tcaaaagcta ctccaccaac tgggcttttc tgatgaacaa atccttacag tgaagacttc 300
 tggcagtggg accccatctg ggagttcagc agattcttca accagctcca gcagcagcag 360
 cagtggggtt ttagtttctt catatgcc atg gag cag gag aaa tcc etc cct 412

ggg	gta	gtg	atg	gct	ctc	gta	tgt	aac	gta	ttt	gac	atg	ctt	tat	cag	460
Gly	Val	Val	Met	Ala	Leu	Val	Cys	Asn	Val	Phe	Asp	Met	Leu	Tyr	Gln	
10						15			20							
ctc	gcc	aat	ctg	gaa	gag	cca	agg	ata	act	cta	cga	gta	cgg	aag	ctt	508
Leu	Ala	Asn	Leu	Glu	Glu	Pro	Arg	Ile	Thr	Leu	Arg	Val	Arg	Lys	Leu	
25			30			35			40							
ctg	ctc	ttg	ata	ccc	act	gat	cca	gcc	att	cag	gaa	gcc	ctt	gat	caa	556
Leu	Leu	Leu	Ile	Pro	Thr	Asp	Pro	Ala	Ile	Gln	Glu	Ala	Leu	Asp	Gln	
			45			50			55							
ctt	gat	tct	tta	gga	aga	aag	aaa	aca	ttg	ctg	tct	gaa	tca	agt	tct	604
Leu	Asp	Ser	Leu	Gly	Arg	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	
60						65			70							
cag	tcc	tca	aaa	tct	cca	tcc	ctg	tca	tca	aag	caa	cag	cac	cag	cca	652
Gln	Ser	Ser	Lys	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	Gln	Gln	His	Gln	Pro	
75			80			85										
agt	gcc	agt	tca	att	tta	gaa	agt	ctg	ttt	cga	tct	ttt	gcc	ccg	gga	700
Ser	Ala	Ser	Ser	Ile	Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Arg	Ser	Phe	Ala	Pro	Gly	
90			95			100										
atg	tct	acc	ttc	aga	gtg	ctc	tac	aac	tta	gaa	gtt	cta	agc	tcc	aaa	748
Met	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Leu	Tyr	Asn	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Ser	Lys	
105			110			115			120							
ctc	atg	cca	aca	gct	gat	gat	gac	atg	gcc	aga	agc	tgt	gcc	aaa	tcc	796
Leu	Met	Pro	Thr	Ala	Asp	Asp	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Cys	Ala	Lys	Ser	
			125			130			135							
ttc	tgt	gaa	aac	ttc	ctc	aaa	gct	ggc	ggg	ttg	agt	ttg	gtt	gta	aat	844
Phe	Cys	Glu	Asn	Phe	Leu	Lys	Ala	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Val	Val	Asn	
140			145			150										
gtc	atg	cag	aga	gac	tcc	atc	cca	tca	gaa	gta	gac	tat	gaa	aca	agg	892
Val	Met	Gln	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro	Ser	Glu	Val	Asp	Tyr	Glu	Thr	Arg	
155			160			165										
cag	ggg	gtt	tat	tcc	atc	tgt	cta	cag	ctt	gca	aga	ttt	tta	ctt	gtc	940
Gln	Gly	Val	Tyr	Ser	Ile	Cys	Leu	Gln	Leu	Ala	Arg	Phe	Leu	Leu	Val	
170			175			180										
gga	caa	aca	atg	ccc	acg	tta	tta	gat	gaa	gac	ctc	acc	aaa	gat	ggg	988
Gly	Gln	Thr	Met	Pro	Thr	Leu	Leu	Asp	Glu	Asp	Leu	Thr	Lys	Asp	Gly	
185			190			195			200							

ata gaa gca ctt tct tcc cgc cca ttc cga aat gtc agc cgg cag aca	1036
Ile Glu Ala Leu Ser Ser Arg Pro Phe Arg Asn Val Ser Arg Gln Thr	
205 210 215	
agc aga cag atg tcc tta tgt ggt acc cca gaa aag tca tcc tac cga	1084
Ser Arg Gln Met Ser Leu Cys Gly Thr Pro Glu Lys Ser Ser Tyr Arg	
220 225 230	
cag ttg tcc gtg tct gat agg tct tct att agg gtt gag gaa atc atc	1132
Gln Leu Ser Val Ser Asp Arg Ser Ser Ile Arg Val Glu Glu Ile Ile	
235 240 245	
cct gct gct cga gtt gca ata caa aca atg gaa gta agt gat ttc act	1180
Pro Ala Ala Arg Val Ala Ile Gln Thr Met Glu Val Ser Asp Phe Thr	
250 255 260	
tct act gtg gct tgc ttc atg aga ttg tca tgg gct gcg gct gca gga	1228
Ser Thr Val Ala Cys Phe Met Arg Leu Ser Trp Ala Ala Ala Ala Gly	
265 270 275 280	
cgg ctt gat ctt gtt ggg agt agc cag cca att aaa gaa agt aat tcc	1276
Arg Leu Asp Leu Val Gly Ser Ser Gln Pro Ile Lys Glu Ser Asn Ser	
285 290 295	
ctg tgt cct gct gga att cga aac aga ctc agc agt tca gga agc aat	1324
Leu Cys Pro Ala Gly Ile Arg Asn Arg Leu Ser Ser Ser Gly Ser Asn	
300 305 310	
tgc agc tct gga agt gaa gga gaa cca gta gcc ctg cat gcg gga atc	1372
Cys Ser Ser Gly Ser Glu Gly Glu Pro Val Ala Leu His Ala Gly Ile	
315 320 325	
tgt gtt cga caa cag tct gta tcc acc aaa gac tcg ctg att gcg gga	1420
Cys Val Arg Gln Gln Ser Val Ser Thr Lys Asp Ser Leu Ile Ala Gly	
330 335 340	
gag gct ttg tct ctt ctt gtt acg tgc cta cag ctt cgg agc cag caa	1468
Glu Ala Leu Ser Leu Leu Val Thr Cys Leu Gln Leu Arg Ser Gln Gln	
345 350 355 360	
ctg gca tct ttc tat aac ttg ccc tgt gtt gct gat ttc atc att gat	1516
Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Leu Pro Cys Val Ala Asp Phe Ile Ile Asp	
365 370 375	
att ctg ctc gga tca cca agt gct gag att cgc cgg gtt gcc tgt gat	1564
Ile Leu Leu Gly Ser Pro Ser Ala Glu Ile Arg Arg Val Ala Cys Asp	
380 385 390	
cag ctg tac act ctt agt cag aca gac aca tca gcg cat cca gat gtg	1612

Gln Leu Tyr Thr Leu Ser Gln Thr Asp Thr Ser Ala His Pro Asp Val	
395 400 405	
cag aag cca aat cag ttt ctt cta ggc gta atc ctc acg gct cag ctg	1660
Gln Lys Pro Asn Gln Phe Leu Leu Gly Val Ile Leu Thr Ala Gln Leu	
410 415 420	
cct ctc tgg tct cca act agt att atg aga gga gtc aat cag aga ctg	1708
Pro Leu Trp Ser Pro Thr Ser Ile Met Arg Gly Val Asn Gln Arg Leu	
425 430 435 440	
tta tct cag tgt atg gag tat ttt gat ttg aga tgc cag tta tta gat	1756
Leu Ser Gln Cys Met Glu Tyr Phe Asp Leu Arg Cys Gln Leu Leu Asp	
445 450 455	
gat ctg aca act tca gaa atg gag cag tta agg atc agc cca gct acg	1804
Asp Leu Thr Thr Ser Glu Met Glu Gln Leu Arg Ile Ser Pro Ala Thr	
460 465 470	
atg ctt gaa gat gag att act tgg ctg gat aac ttt gaa cct aat cgt	1852
Met Leu Glu Asp Glu Ile Thr Trp Leu Asp Asn Phe Glu Pro Asn Arg	
475 480 485	
aca gct gaa tgt gag acc agt gaa gcg gac aac atc tta ctg gca ggg	1900
Thr Ala Glu Cys Glu Thr Ser Glu Ala Asp Asn Ile Leu Leu Ala Gly	
490 495 500	
cac tta cgc ctc atc aag acc ctt ctt tca ctc tgt ggg gca gaa aag	1948
His Leu Arg Leu Ile Lys Thr Leu Leu Ser Leu Cys Gly Ala Glu Lys	
505 510 515 520	
gaa atg ctt ggt tca tca ctc att aaa cca ttg tta gat gac ttc ctt	1996
Glu Met Leu Gly Ser Ser Leu Ile Lys Pro Leu Leu Asp Asp Phe Leu	
525 530 535	
ttc cga gct tct aga att att tta aat agt cat tct cca gct ggc agt	2044
Phe Arg Ala Ser Arg Ile Ile Leu Asn Ser His Ser Pro Ala Gly Ser	
540 545 550	
gcc gcc atc agt caa cag gac ttt cat cca aag tgt agt aca gcg aat	2092
Ala Ala Ile Ser Gln Gln Asp Phe His Pro Lys Cys Ser Thr Ala Asn	
555 560 565	
agc cga ttg gca gcc tat gaa gtc ctt gtg atg ttg gct gat agt tca	2140
Ser Arg Leu Ala Ala Tyr Glu Val Leu Val Met Leu Ala Asp Ser Ser	
570 575 580	
cct tca aat ctt caa att att ata aaa gaa ctg ctt tct atg cat cac	2188
Pro Ser Asn Leu Gln Ile Ile Ile Lys Glu Leu Leu Ser Met His His	
585 590 595 600	

cag cct gac cct gct ctt acc aag gag ttt gat tac ctt ccc cca gtg	2236
Gln Pro Asp Pro Ala Leu Thr Lys Glu Phe Asp Tyr Leu Pro Pro Val	
605 610 615	
gat agc agg tcc agt tca ggg ttt gtg ggg ctg aga aat ggt ggt gca	2284
Asp Ser Arg Ser Ser Ser Gly Phe Val Gly Leu Arg Asn Gly Gly Ala	
620 625 630	
act tgt tat atg aat gca gtc ttc cag cag ctg tat atg caa cct ggg	2332
Thr Cys Tyr Met Asn Ala Val Phe Gln Gln Leu Tyr Met Gln Pro Gly	
635 640 645	
ctc cct gag tca tta ctt tca gtg gat gat gac aca gac aat cca gat	2380
Leu Pro Glu Ser Leu Leu Ser Val Asp Asp Asp Thr Asp Asn Pro Asp	
650 655 660	
gat agc gtg ttt tac caa gtg cag tct ctc ttt gga cat tta atg gaa	2428
Asp Ser Val Phe Tyr Gln Val Gln Ser Leu Phe Gly His Leu Met Glu	
665 670 675 680	
agc aag ctg cag tac tat gta cct gag aat ttt tgg aag att ttc aag	2476
Ser Lys Leu Gln Tyr Tyr Val Pro Glu Asn Phe Trp Lys Ile Phe Lys	
685 690 695	
atg tgg aat aaa gaa ctt tat gtg aga gaa cag cag gat gca tat gaa	2524
Met Trp Asn Lys Glu Leu Tyr Val Arg Glu Gln Gln Asp Ala Tyr Glu	
700 705 710	
ttc ttt act agt ctc att gat cag atg gat gaa tac ctc aag aaa atg	2572
Phe Phe Thr Ser Leu Ile Asp Gln Met Asp Glu Tyr Leu Lys Lys Met	
715 720 725	
ggg aga gac caa att ttt aag aat aca ttt cag ggc atc tac tct gat	2620
Gly Arg Asp Gln Ile Phe Lys Asn Thr Phe Gln Gly Ile Tyr Ser Asp	
730 735 740	
cag aag atc tgt aaa gac tgt cct cac aga tat gag cgt gaa gaa gct	2668
Gln Lys Ile Cys Lys Asp Cys Pro His Arg Tyr Glu Arg Glu Glu Ala	
745 750 755 760	
ttc atg gct ctc aat cta gga gtg act tct tgt cag agt ttg gaa att	2716
Phe Met Ala Leu Asn Leu Gly Val Thr Ser Cys Gln Ser Leu Glu Ile	
765 770 775	
tct ttg gac caa ttt gtt aga gga gaa gtt cta gaa gga agt aat gcg	2764
Ser Leu Asp Gln Phe Val Arg Gly Glu Val Leu Glu Gly Ser Asn Ala	
780 785 790	
tac tac tgt gaa aag tgt aaa gaa aag aga ata aca gtg aaa agg acc	2812

Tyr Tyr Cys Glu Lys Cys Lys Glu Lys Arg Ile Thr Val Lys Arg Thr	
795	800 805
tgt att aaa tct tta cct agc gtc ttg gta att cac cta atg aga ttt	2860
Cys Ile Lys Ser Leu Pro Ser Val Leu Val Ile His Leu Met Arg Phe	
810	815 820
ggg ttt gac tgg gaa agc gga cgc tcc att aaa tat gat gaa caa ata	2908
Gly Phe Asp Trp Glu Ser Gly Arg Ser Ile Lys Tyr Asp Glu Gln Ile	
825	830 835 840
agg ttt ccc tgg atg cta aac atg gag cct tac aca gtt tca gga atg	2956
Arg Phe Pro Trp Met Leu Asn Met Glu Pro Tyr Thr Val Ser Gly Met	
845	850 855
gct cgc caa gat tct tct tct gaa gtt ggg gaa aat ggg cga agt gtg	3004
Ala Arg Gln Asp Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Asn Gly Arg Ser Val	
860	865 870
gat cag ggc ggt gga gga tcc cca cga aaa aag gtt gcc ctc aca gaa	3052
Asp Gln Gly Gly Gly Gly Ser Pro Arg Lys Lys Val Ala Leu Thr Glu	
875	880 885
aac tat gaa ctt gtc ggt gtc atc gta cac agt ggg cag gca cac gca	3100
Asn Tyr Glu Leu Val Gly Val Ile Val His Ser Gly Gln Ala His Ala	
890	895 900
ggc cac tac tat tcc ttc att aag gac agg cga ggg tgt gga aaa gga	3148
Gly His Tyr Tyr Ser Phe Ile Lys Asp Arg Arg Gly Cys Gly Lys Gly	
905	910 915 920
aag tgg tat aaa ttt aat gac aca gtt ata gaa gaa ttt gac cta aat	3196
Lys Trp Tyr Lys Phe Asn Asp Thr Val Ile Glu Glu Phe Asp Leu Asn	
925	930 935
gac gag acc ctg gag tat gaa tgc ttt gga gga gaa tat aga cca aaa	3244
Asp Glu Thr Leu Glu Tyr Glu Cys Phe Gly Gly Glu Tyr Arg Pro Lys	
940	945 950
gtt tat gat caa aca aac cca tac act gat gtg cgc cga aga tac tgg	3292
Val Tyr Asp Gln Thr Asn Pro Tyr Thr Asp Val Arg Arg Arg Tyr Trp	
955	960 965
aat gcc tat atg ctt ttc tac caa agg gtg tct gat cag aac tcc cca	3340
Asn Ala Tyr Met Leu Phe Tyr Gln Arg Val Ser Asp Gln Asn Ser Pro	
970	975 980
gta tta cca aag aaa agt cga gtc agc gtt gta cgg cag gaa gct gag	3388
Val Leu Pro Lys Lys Ser Arg Val Ser Val Val Arg Gln Glu Ala Glu	
985	990 995 1000

gat ctc tct ctg tca gct cca tct tca cca gaa att tca cct cag tca	3436
Asp Leu Ser Leu Ser Ala Pro Ser Ser Pro Glu Ile Ser Pro Gln Ser	
1005 1010 1015	
tcc cct cgg ccc cat agg ccg aac aat gac cgg ctg tct att ctt acc	3484
Ser Pro Arg Pro His Arg Pro Asn Asn Asp Arg Leu Ser Ile Leu Thr	
1020 1025 1030	
aag ctg gtt aaa aaa ggc gag aag aaa gga ctg ttt gtg gag aaa atg	3532
Lys Leu Val Lys Lys Gly Glu Lys Lys Gly Leu Phe Val Glu Lys Met	
1035 1040 1045	
cct gct cga ata tac cag atg gtg aga gat gag aac ctc aag ttt atg	3580
Pro Ala Arg Ile Tyr Gln Met Val Arg Asp Glu Asn Leu Lys Phe Met	
1050 1055 1060	
aag aat aga gat gta tac agt agt gat tat ttc agt ttt gtt ttg tct	3628
Lys Asn Arg Asp Val Tyr Ser Ser Asp Tyr Phe Ser Phe Val Leu Ser	
1065 1070 1075 1080	
tta gct tca ttg aat gct act aaa tta aag cat cca tat tat cct tgc	3676
Leu Ala Ser Leu Asn Ala Thr Lys Leu Lys His Pro Tyr Tyr Pro Cys	
1085 1090 1095	
atg gca aag gtg agc tta cag ctt gct att caa ttc ctt ttt caa act	3724
Met Ala Lys Val Ser Leu Gln Leu Ala Ile Gln Phe Leu Phe Gln Thr	
1100 1105 1110	
tat cta cgg aca aag aag aaa ctc agg gtt gat act gaa gaa tgg att	3772
Tyr Leu Arg Thr Lys Lys Lys Leu Arg Val Asp Thr Glu Glu Trp Ile	
1115 1120 1125	
gct acc att gaa gca ttg ctt tca aaa agt ttt gat gct tgt cag tgg	3820
Ala Thr Ile Glu Ala Leu Leu Ser Lys Ser Phe Asp Ala Cys Gln Trp	
1130 1135 1140	
tta gtt gaa tat ttt att agt tct gaa gga cga gaa ttg ata aag att	3868
Leu Val Glu Tyr Phe Ile Ser Ser Glu Gly Arg Glu Leu Ile Lys Ile	
1145 1150 1155 1160	
ttc tta ctg gag tgc aat gtg aga gaa gta cga gtt gct gtg gcc acc	3916
Phe Leu Leu Glu Cys Asn Val Arg Glu Val Arg Val Ala Val Ala Thr	
1165 1170 1175	
att ctg gag aaa acc cta gac agt gcc ttg ttt tat cag gat aag tta	3964
Ile Leu Glu Lys Thr Leu Asp Ser Ala Leu Phe Tyr Gln Asp Lys Leu	
1180 1185 1190	
aaa agc ctt cat cag tta ctg gag gta cta ctt gct ctg ttg gac aaa	4012

Lys Ser Leu His Gln Leu Leu Glu Val Leu Leu Ala Leu Leu Asp Lys	
1195	1200 1205
gac gtc cca gaa aat tgt aaa aac tgt gct cag tac ttt ttc ctg ttc	4060
Asp Val Pro Glu Asn Cys Lys Asn Cys Ala Gln Tyr Phe Phe Leu Phe	
1210	1215 1220
aac act ttt gta caa aag caa gga att agg gct gga gat ctt ctt ctg	4108
Asn Thr Phe Val Gln Lys Gln Gly Ile Arg Ala Gly Asp Leu Leu Leu	
1225	1230 1235 1240
agg cat tca gct ctg cgg cac atg atc agc ttc ctc cta ggg gcc agt	4156
Arg His Ser Ala Leu Arg His Met Ile Ser Phe Leu Leu Gly Ala Ser	
1245	1250 1255
cgg caa aac aat cag ata cgt cga tgg agt tca gca caa gca cga gaa	4204
Arg Gln Asn Asn Gln Ile Arg Arg Trp Ser Ser Ala Gln Ala Arg Glu	
1260	1265 1270
ttt ggg aat ctt cac aat aca gtg gcg tta ctt gtt ttg cat tca gat	4252
Phe Gly Asn Leu His Asn Thr Val Ala Leu Leu Val Leu His Ser Asp	
1275	1280 1285
gtc tca tcc caa agg aat gtt gct cct ggc ata ttt aag caa cga cca	4300
Val Ser Ser Gln Arg Asn Val Ala Pro Gly Ile Phe Lys Gln Arg Pro	
1290	1295 1300
ccc att agc att gct ccc tca agc cct ctg ttg ccc ctc cat gag gag	4348
Pro Ile Ser Ile Ala Pro Ser Ser Pro Leu Leu Pro Leu His Glu Glu	
1305	1310 1315 1320
gta gaa gcc ttg ttg ttc atg tct gaa ggg aaa cct tac ctg tta gag	4396
Val Glu Ala Leu Leu Phe Met Ser Glu Gly Lys Pro Tyr Leu Leu Glu	
1325	1330 1335
gta atg ttt gct ttg cgg gag ctg aca ggc tcg ctc ttg gca ctc att	4444
Val Met Phe Ala Leu Arg Glu Leu Thr Gly Ser Leu Leu Ala Leu Ile	
1340	1345 1350
gag atg gta gtg tac tgc tgt ttc tgt aat gag cat ttt tcc ttc aca	4492
Glu Met Val Val Tyr Cys Cys Phe Cys Asn Glu His Phe Ser Phe Thr	
1355	1360 1365
atg ctg cat ttc att aag aac caa cta gaa acg gct cca cct cat gag	4540
Met Leu His Phe Ile Lys Asn Gln Leu Glu Thr Ala Pro Pro His Glu	
1370	1375 1380
tta aag aat acg ttc caa cta ctt cat gaa ata ttg gtt att gaa gat	4588
Leu Lys Asn Thr Phe Gln Leu Leu His Glu Ile Leu Val Ile Glu Asp	
1385	1390 1395 1400

cct ata caa gca gag cga gtc aaa ttt gtg ttt gag aca gaa aat gga 4636
 Pro Ile Gln Ala Glu Arg Val Lys Phe Val Phe Glu Thr Glu Asn Gly
 1405 1410 1415

tta cta gct ttg atg cac cac agt aat cat gtg gac agt agt cgc tgc 4684
 Leu Leu Ala Leu Met His His Ser Asn His Val Asp Ser Ser Arg Cys
 1420 1425 1430

tac cag tgt gtc aaa ttt ctt gtc act ctt gct caa aag tgt cct gca 4732
 Tyr Gln Cys Val Lys Phe Leu Val Thr Leu Ala Gln Lys Cys Pro Ala
 1435 1440 1445

gct aag gag tac ttc aag gag aat tcc cac cac tgg agc tgg gct gtg 4780
 Ala Lys Glu Tyr Phe Lys Glu Asn Ser His His Trp Ser Trp Ala Val
 1450 1455 1460

cag tgg cta cag aag aag atg tca gaa cat tac tgg aca cca cag agt 4828
 Gln Trp Leu Gln Lys Lys Met Ser Glu His Tyr Trp Thr Pro Gln Ser
 1465 1470 1475 1480

aat gtc tct aat gaa aca tca act gga aaa acc ttt cag cga acc att 4876
 Asn Val Ser Asn Glu Thr Ser Thr Gly Lys Thr Phe Gln Arg Thr Ile
 1485 1490 1495

tca gct cag gac acg tta gcg tat gcc aca gct ttg ttg aat gaa aaa 4924
 Ser Ala Gln Asp Thr Leu Ala Tyr Ala Thr Ala Leu Leu Asn Glu Lys
 1500 1505 1510

gag caa tca gga agc agt aat ggg tcg gag agt agt cct gcc aat gag 4972
 Glu Gln Ser Gly Ser Ser Asn Gly Ser Glu Ser Ser Pro Ala Asn Glu
 1515 1520 1525

aac gga gac agg cat cta cag cag ggt tca gaa tct ccc atg atg att 5020
 Asn Gly Asp Arg His Leu Gln Gln Gly Ser Glu Ser Pro Met Met Ile
 1530 1535 1540

ggt gag ttg aga agt gac ctt gat gat gtt gat ccc tag aggaacatgc 5069
 Gly Glu Leu Arg Ser Asp Leu Asp Asp Val Asp Pro
 1545 1550 1555

ccagcctgag aggagtcaag acacaatact ggatgctcag caccttcttg gaatcagaat 5129

ctcgaaacct ttgaagagc ctggagattg gactgggaaa gctgctgtga cttgggcgga 5189

tcgtgtatct ctcaaggaaa gcatttttaa gccactagaa ggtttgggag ctgtttggca 5249

gtgggagaac tccggcatgt ggaacagctg tcccgggagc gtggtctata tgtggattca 5309

catttctgtg gagattttcg gaaatagagc cagtggcaga cttttttgtt acacgaacat 5369

acaagagtga gcataaagct gttgctttct ctacgatgct acaaaagaaa ttccctttggt 5429
 ttttatatTT taagaaaaag caagctgctt ttagatatgt gggggcaaat ttttaatctt 5489
 gcagtaatat taaacaggaa tatccaatTT aaaatgatgt aaagatglaa taaaattcct 5549
 tticattgta aaatagtaat taagtcaatt tacacagacc ttgtatttta atatgtctcc 5609
 ctatttTtat agaatttcag atgggtctag atgagaaccc tatgcataag cttggatctt 5669
 gatgaaaggt taccaggatc aggatcaaaa attgggaaat actaagctct tgaagatatt 5729
 tttctgatat aattagattg aaaagagcaa ttttgaaaat gctgtgttct ccagaagtac 5789
 aggtgcatt atttgacatc aattacttaa agaagttatg agttgttccc caaacagatt 5849
 ttaaaaacag caaaataaaa gcactttaag atataatTTT actgagttta acttcacaga 5909
 attatctTTT taatgcttgg agacatattg aataaactgt agtcttaaT catgtgatct 5969
 gcaatcgTTT gcttttgctt aaaacataat tactgaaacc cttggtattg gttgtatatg 6029
 aagttaacta ttgagttgg tacacactgc ttgtgagttt catagttatt gtaatgcaga 6089
 gaaggaaTTT gagaatttgt ttctctcaa catgactaat taacactgaa aagtcagtca 6149
 aggtttaaga tttattttcc cagaaataaa tataaagcaa ttgaataacc atccatttag 6209
 tcgtattttcc aaagtatagc accattcact catttatacc agctcccttt tatggtgtgg 6269
 gggagaggtt tacaccacaa tatttcatat atattttgta cattttgtat tttgaattgc 6329
 tcacattttc ggccctgttt tgcccttagt tacaggctct gccttatttt catctcacca 6389
 tgcacagaac tagggagcct taggaagtgc caggttttca ctgtcagatt tgccaagtca 6449
 cagaggcgca gccagccctg aagtgcctgt ctggctgctg tggcattgtg tgggcatgtg 6509
 gccaggcaga tggcatctca ttactgtget ctgccatgg cccagtcttt tcattctctg 6569
 gcagtgaggg tttctgtget gtcagacttc attgttattc tgtgacttgc tggaggttgg 6629
 cagtggcctt tgtcaaacac actgagaaga tggaagggcc agcacttaag agcagaactg 6689
 tacccttaga gaaacggaca gaggcgagtg gcaaacttca gacggttcca atggtcttgc 6749
 agtttgaaat gtgatgttct accattggtt ttgagtacgt gaatacttcc tgtcctactg 6809
 ttccccctac cctattctca cttctctcc gccacatcc tcaccaagag attgtgtggg 6869

acatgacctt gaaatgetgg cgatgatcca cactgggata tcategetgg cgactgcact 6929
 ctgaggagcc caaaatcagg agtgaaattg ccacttctag tccccttatt tcctatggaa 6989
 acaacgcctt ccgcacccct agcacctgcc gtcctcactg taaaggttca tcaggatcgt 7049
 ccaccgtgta tattatagc ttcagatcat gttgcttata ttgttgetgc aatgaccatc 7109
 gttttcactt tgctggaac cacttgattg ctgacagcta cagtcaatga acctgetgat 7169
 gactttttt aatgtagtac aacagtgaca gttatgacag gcttaccttg gaagagttgt 7229
 catttttact gccaattttt tggatgaaga tgtttttata aacctttcaa aatggctctgc 7289
 aaacagagca ggaattgcac aattaactca ataatgetgt gtgttctcaa gaagctccct 7349
 tagtgaggcc gatcttaaga tggccgatcc tggccgttga aggcatectg ggaaagaaaa 7409
 caagcatccc agcgggcate tcaccagcac ttctcctgga gtctcacac ggtcactgac 7469
 aactacagtc agtttttaga actagagtgc cgtatcatca gacttacct gtctgcccc 7529
 accttccctg ctaacatcga ggtgtgtgca gttaccttct gagcttggaa caagcagact 7589
 ggaattttcc tctgtacct cttgtgtata aaatcttggt tataaaattt caaaaggaag 7649
 tagatacact aggaagaac cttaattcta aatttggttc atgtgtggca aagttcttag 7709
 cttctaagag tataaaataa atttttcaaa aacag 7744

<210> 3
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Met Glu Gln Glu Lys Ser Leu Pro Gly Val Val Met Ala Leu Val Cys
 1 5 10 15
 Asn Val Phe Asp Met Leu Tyr Gln Leu Ala Asn Leu Glu Glu Pro Arg
 20 25 30
 Ile Thr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Leu Leu Ile Pro Thr Asp Pro
 35 40 45
 Ala Ile Gln Glu Ala Leu Asp Gln Leu Asp Ser Leu Gly Arg Lys Lys
 50 55 60

Thr	Leu	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Lys	Ser	Pro	Ser	Leu
65					70				75					80	
Ser	Ser	Lys	Gln	Gln	His	Gln	Pro	Ser	Ala	Ser	Ser	Ile	Leu	Glu	Ser
			85					90					95		
Leu	Phe	Arg	Ser	Phe	Ala	Pro	Gly	Met	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Leu	Tyr
		100					105					110			
Asn	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Met	Pro	Thr	Ala	Asp	Asp	Asp
	115						120				125				
Met	Ala	Arg	Ser	Cys	Ala	Lys	Ser	Phe	Cys	Glu	Asn	Phe	Leu	Lys	Ala
	130					135					140				
Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Val	Val	Asn	Val	Met	Gln	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro
145				150					155					160	
Ser	Glu	Val	Asp	Tyr	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly	Val	Tyr	Ser	Ile	Cys	Leu
			165					170					175		
Gln	Leu	Ala	Arg	Phe	Leu	Leu	Val	Gly	Gln	Thr	Met	Pro	Thr	Leu	Leu
		180						185					190		
Asp	Glu	Asp	Leu	Thr	Lys	Asp	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Ser	Ser	Arg	Pro
	195						200					205			
Phe	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gln	Thr	Ser	Arg	Gln	Met	Ser	Leu	Cys	Gly
	210					215					220				
Thr	Pro	Glu	Lys	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gln	Leu	Ser	Val	Ser	Asp	Arg	Ser
225					230					235				240	
Ser	Ile	Arg	Val	Glu	Glu	Ile	Ile	Pro	Ala	Ala	Arg	Val	Ala	Ile	Gln
			245					250					255		
Thr	Met	Glu	Val	Ser	Asp	Phe	Thr	Ser	Thr	Val	Ala	Cys	Phe	Met	Arg
		260						265					270		
Leu	Ser	Trp	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Arg	Leu	Asp	Leu	Val	Gly	Ser	Ser
		275					280					285			
Gln	Pro	Ile	Lys	Glu	Ser	Asn	Ser	Leu	Cys	Pro	Ala	Gly	Ile	Arg	Asn
	290					295						300			
Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn	Cys	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Gly	Glu
305				310						315				320	
Pro	Val	Ala	Leu	His	Ala	Gly	Ile	Cys	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Val	Ser
			325						330					335	

Thr Lys Asp Ser Leu Ile Ala Gly Glu Ala Leu Ser Leu Leu Val Thr
 340 345 350

Cys Leu Gln Leu Arg Ser Gln Gln Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Leu Pro
 355 360 365

Cys Val Ala Asp Phe Ile Ile Asp Ile Leu Leu Gly Ser Pro Ser Ala
 370 375 380

Glu Ile Arg Arg Val Ala Cys Asp Gln Leu Tyr Thr Leu Ser Gln Thr
 385 390 395 400

Asp Thr Ser Ala His Pro Asp Val Gln Lys Pro Asn Gln Phe Leu Leu
 405 410 415

Gly Val Ile Leu Thr Ala Gln Leu Pro Leu Trp Ser Pro Thr Ser Ile
 420 425 430

Met Arg Gly Val Asn Gln Arg Leu Leu Ser Gln Cys Met Glu Tyr Phe
 435 440 445

Asp Leu Arg Cys Gln Leu Leu Asp Asp Leu Thr Thr Ser Glu Met Glu
 450 455 460

Gln Leu Arg Ile Ser Pro Ala Thr Met Leu Glu Asp Glu Ile Thr Trp
 465 470 475 480

Leu Asp Asn Phe Glu Pro Asn Arg Thr Ala Glu Cys Glu Thr Ser Glu
 485 490 495

Ala Asp Asn Ile Leu Leu Ala Gly His Leu Arg Leu Ile Lys Thr Leu
 500 505 510

Leu Ser Leu Cys Gly Ala Glu Lys Glu
 515 520

<210> 4
 <211> 1563
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1563)

<400> 4
 atg gag cag gag aaa tcc ctc cct ggt gta gtg atg gct ctc gta tgt 48
 Met Glu Gln Glu Lys Ser Leu Pro Gly Val Val Met Ala Leu Val Cys

1	5	10	15	
aac gta ttt gac atg ctt tat cag ctc gcc aat ctg gaa gag cca agg				96
Asn Val Phe Asp Met Leu Tyr Gln Leu Ala Asn Leu Glu Glu Pro Arg				
	20	25	30	
ata act cta cga gta cgg aag ctt ctg ctc ttg ata ccc act gat cca				144
Ile Thr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Leu Leu Ile Pro Thr Asp Pro				
	35	40	45	
gcc att cag gaa gcc ctt gat caa ctt gat tct tta gga aga aag aaa				192
Ala Ile Gln Glu Ala Leu Asp Gln Leu Asp Ser Leu Gly Arg Lys Lys				
	50	55	60	
aca ttg ctg tct gaa tca agt tct cag tcc tca aaa tct cca tcc ctg				240
Thr Leu Leu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Ser Ser Lys Ser Pro Ser Leu				
	65	70	75	80
tca tca aag caa cag cac cag cca agt gcc agt tca att tta gaa agt				288
Ser Ser Lys Gln Gln His Gln Pro Ser Ala Ser Ser Ile Leu Glu Ser				
	85	90	95	
ctg ttt cga tct ttt gcc ccg gga atg tct acc ttc aga gtg ctc tac				336
Leu Phe Arg Ser Phe Ala Pro Gly Met Ser Thr Phe Arg Val Leu Tyr				
	100	105	110	
aac tta gaa gtt cta agc tcc aaa ctc atg cca aca gct gat gat gac				384
Asn Leu Glu Val Leu Ser Ser Lys Leu Met Pro Thr Ala Asp Asp Asp				
	115	120	125	
atg gcc aga agc tgt gcc aaa tcc ttc tgt gaa aac ttc ctc aaa gct				432
Met Ala Arg Ser Cys Ala Lys Ser Phe Cys Glu Asn Phe Leu Lys Ala				
	130	135	140	
ggc ggt ttg agt ttg gtt gta aat gtc atg cag aga gac tcc atc cca				480
Gly Gly Leu Ser Leu Val Val Asn Val Met Gln Arg Asp Ser Ile Pro				
	145	150	155	160
tca gaa gta gac tat gaa aca agg cag ggt gtt tat tcc atc tgt cta				528
Ser Glu Val Asp Tyr Glu Thr Arg Gln Gly Val Tyr Ser Ile Cys Leu				
	165	170	175	
cag ctt gca aga ttt tta ctt gtc gga caa aca atg ccc acg tta tta				576
Gln Leu Ala Arg Phe Leu Leu Val Gly Gln Thr Met Pro Thr Leu Leu				
	180	185	190	
gat gaa gac ctc acc aaa gat ggt ata gaa gca ctt tct tcc cgc cca				624
Asp Glu Asp Leu Thr Lys Asp Gly Ile Glu Ala Leu Ser Ser Arg Pro				
	195	200	205	

ttc cga aat gtc agc cgg cag aca agc aga cag atg tcc tta tgt ggt	672
Phe Arg Asn Val Ser Arg Gln Thr Ser Arg Gln Met Ser Leu Cys Gly	
210 215 220	
acc cca gaa aag tca tcc tac cga cag ttg tcc gtg tct gat agg tct	720
Thr Pro Glu Lys Ser Ser Tyr Arg Gln Leu Ser Val Ser Asp Arg Ser	
225 230 235 240	
tct att agg gtt gag gaa atc atc cct gct gct cga gtt gca ata caa	768
Ser Ile Arg Val Glu Glu Ile Ile Pro Ala Ala Arg Val Ala Ile Gln	
245 250 255	
aca atg gaa gta agt gat ttc act tct act gtg gct tgc ttc atg aga	816
Thr Met Glu Val Ser Asp Phe Thr Ser Thr Val Ala Cys Phe Met Arg	
260 265 270	
ttg tca tgg gct gcg gct gca gga cgg ctt gat ctt gtt ggg agt agc	864
Leu Ser Trp Ala Ala Ala Ala Gly Arg Leu Asp Leu Val Gly Ser Ser	
275 280 285	
cag cca att aaa gaa agt aat tcc ctg tgt cct gct gga att cga aac	912
Gln Pro Ile Lys Glu Ser Asn Ser Leu Cys Pro Ala Gly Ile Arg Asn	
290 295 300	
aga ctc agc agt tca gga agc aat tgc agc tct gga agt gaa gga gaa	960
Arg Leu Ser Ser Ser Gly Ser Asn Cys Ser Ser Gly Ser Glu Gly Glu	
305 310 315 320	
cca gta gcc ctg cat gcg gga atc tgt gtt cga caa cag tct gta tcc	1008
Pro Val Ala Leu His Ala Gly Ile Cys Val Arg Gln Gln Ser Val Ser	
325 330 335	
acc aaa gac tcg ctg att gcg gga gag gct ttg tct ctt ctt gtt acg	1056
Thr Lys Asp Ser Leu Ile Ala Gly Glu Ala Leu Ser Leu Leu Val Thr	
340 345 350	
tgc cta cag ctt cgg agc cag caa ctg gca tct ttc tat aac ttg ccc	1104
Cys Leu Gln Leu Arg Ser Gln Gln Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Leu Pro	
355 360 365	
tgt gtt gct gat ttc atc att gat att ctg ctc gga tca cca agt gct	1152
Cys Val Ala Asp Phe Ile Ile Asp Ile Leu Leu Gly Ser Pro Ser Ala	
370 375 380	
gag att cgc cgg gtt gcc tgt gat cag ctg tac act ctt agt cag aca	1200
Glu Ile Arg Arg Val Ala Cys Asp Gln Leu Tyr Thr Leu Ser Gln Thr	
385 390 395 400	
gac aca tca gcg cat cca gat gtg cag aag cca aat cag ttt ctt cta	1248
Asp Thr Ser Ala His Pro Asp Val Gln Lys Pro Asn Gln Phe Leu Leu	

405	410	415	
ggc gta atc ctc acg gct cag ctg cct ctc tgg tct cca act agt att			1296
Gly Val Ile Leu Thr Ala Gln Leu Pro Leu Trp Ser Pro Thr Ser Ile			
420	425	430	
atg aga gga gtc aat cag aga ctg tta tct cag tgt atg gag tat ttt			1344
Met Arg Gly Val Asn Gln Arg Leu Leu Ser Gln Cys Met Glu Tyr Phe			
435	440	445	
gat ttg aga tgc cag tta tta gat gat ctg aca act tca gaa atg gag			1392
Asp Leu Arg Cys Gln Leu Leu Asp Asp Leu Thr Thr Ser Glu Met Glu			
450	455	460	
cag tta agg atc agc cca gct acg atg ctt gaa gat gag att act tgg			1440
Gln Leu Arg Ile Ser Pro Ala Thr Met Leu Glu Asp Glu Ile Thr Trp			
465	470	475	480
ctg gat aac ttt gaa cct aat cgt aca gct gaa tgt gag acc agt gaa			1488
Leu Asp Asn Phe Glu Pro Asn Arg Thr Ala Glu Cys Glu Thr Ser Glu			
485	490	495	
gcg gac aac atc tta ctg gca ggg cac tta cgc ctc atc aag acc ctt			1536
Ala Asp Asn Ile Leu Leu Ala Gly His Leu Arg Leu Ile Lys Thr Leu			
500	505	510	
ctt tca ctc tgt ggg gca gaa aag gaa			1563
Leu Ser Leu Cys Gly Ala Glu Lys Glu			
515	520		
<210> 5			
<211> 32			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed			
oligonucleotide for using as a primer			
<400> 5			32
aaaaagcagg ctatgcatg gagcaggaga aa			
<210> 6			
<211> 52			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence:Designed			
oligonucleotide for using as a primer			
<400> 6			52
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt ctaggatca acatcatcaa gg			
<210> 7			
<211> 27			

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide for using as a primer
<400> 7
gggacaagtt tgtacaaaaa agcagge 27
<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Designed
oligonucleotide for using as a primer
<400> 8
ggtggtgcaa cttcttatat gaatgcagtc tttag 36

【図面の簡単な説明】

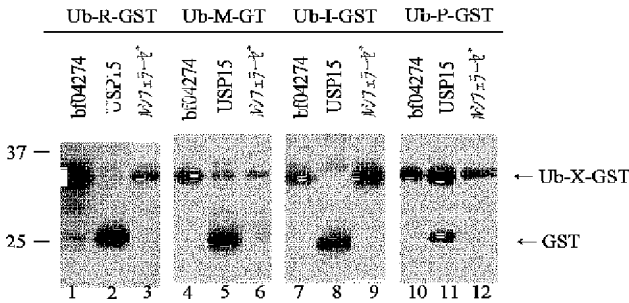
【図1】 bf04274の脱ユビキチン化活性が、bf04274と人工基質（Ub-R-GST、Ub-M-GST、Ub-I-GST、またはUb-P-GST）とを共に大腸菌で発現させた共発現系で認められたことを示す図である。図中、USP15およびルシフェラーゼは、それぞれ脱ユビキチン化活性の陽性コントロールおよび陰性コントロールである。レーン左側の数値は分子量を示す。

【図2】 bf04274の推定酵素活性部位である、N末端から第634番目のシステイン（C）残基をセリン（S）残基に置換すると（bf04274^{C634S}）、その脱ユビキチン化活性が消失したこ

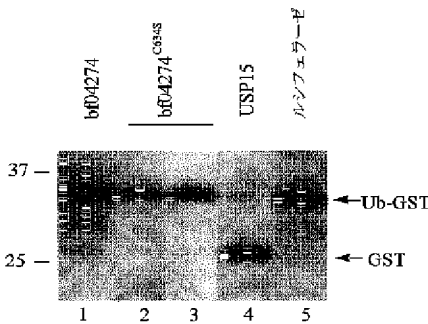
とを示す図である。図中、USP15およびルシフェラーゼは、それぞれ脱ユビキチン化活性の陽性コントロールおよび陰性コントロールである。レーン左側の数値は分子量を示す。

【図3】 bf04274のN末端から521アミノ酸残基を欠失させたKIAA1057-1の脱ユビキチン化活性が、KIAA1057-1と人工基質（Ub-R-GST、Ub-M-GST、Ub-I-GST、またはUb-P-GST）とを共に大腸菌で発現させた共発現系で認められたことを示す図である。図中、USP15およびルシフェラーゼは、それぞれ脱ユビキチン化活性の陽性コントロールおよび陰性コントロールである。レーン左側の数値は分子量を示す。

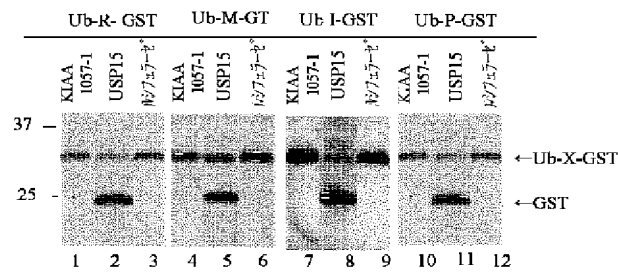
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 P 25/00		A 6 1 P 25/28	4 B 0 6 5
25/16		C 0 7 K 14/81	4 C 0 8 4
25/28		16/40	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/81		C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
16/40		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		9/50	
1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 Q 1/37	
9/50		1/68	A
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/37		33/50	Z
1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A
G 0 1 N 33/15		5/00	A
33/50		A 6 1 K 37/02	

- (72)発明者 長瀬 隆弘
千葉県木更津市矢那1532番3号 財団法人
かずさディー・エヌ・エー研究所内
- (72)発明者 大石 道夫
千葉県木更津市矢那1532番3号 財団法人
かずさディー・エヌ・エー研究所内
- (72)発明者 横田 博
東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第
一製薬株式会社東京研究開発センター内
- (72)発明者 下村 知栄子
東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第
一製薬株式会社東京研究開発センター内

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CA25
CB01 CB03 CB07 CB13 CB21
DA12 DA13 DA20 DA36 DA77
FB01 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA14 BA19 BA61
CA04 DA01 DA02 DA05 DA06
DA11 EA04 GA01 GA11 HA08
HA11 HA19
4B050 CC01 CC03 DD11 EE10 LL01
LL03
4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ13 QQ36
QQ44 QQ53 QR16 QR32 QR42
QR48 QR55 QR62 QR72 QR78
QS28 QS32 QS33 QS34
4B064 AG23 AG26 CA02 CA05 CA10
CA11 CA19 CA20 DA01 DA13
4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X
AA93Y AB01 AB02 BA02
BA08 CA24 CA33 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA20
BA22 BA35 MA52 MA55 MA66
NA14 ZA011 ZA021 ZA161
ZC781
4C085 AA13 AA14 BB11 CC04 CC05
DD22 DD23 DD33 GG01 GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09
CA40 DA75 DA89 EA20 EA50
FA74